ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

ANNEE 1982 N° 24

LES METHODES SEROLOGIQUES POUR LA RECHERCHE DES SUBSTANCES ETRANGERES DANS LES DENREES ANIMALES OU D'ORIGINE ANIMALE

THESE

POUR LE DOCTORAT VETERINAIRE
(diplôme d'Etat)
présentée et soutenue publiquement en 1982
devant
L'UNIVERSITE PAUL-SABATIER DE TOULOUSE
par

LECAVELIER Alain, Claude, Bernard
Né le 14 Juillet 1954 à CHERBOURG (MANCHE)

JURY :
Président :
M. ROUX, Professeur à l'Université Paul-Sabatier de Toulouse
Assesseurs :
M. LABIE, Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
M. LAUTIE, Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Association des Elèves
ENVT

UNIV.
LEIDEN
1878

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

ANNEE 1982 N° 24

LES METHODES SEROLOGIQUES POUR LA RECHERCHE DES SUBSTANCES ETRANGERES DANS LES DENREES ANIMALES OU D'ORIGINE ANIMALE

THESE

POUR LE DOCTORAT VETERINAIRE

(diplôme d'Etat)

présentée et soutenue publiquement en 1982

devant

L'UNIVERSITE PAUL-SABATIER DE TOULOUSE

par

LECAVELIER Alain, Claude, Bernard

Né le 14 Juillet 1954 à CHERBOURG (MANCHE)

JURY :

Président :

M. ROUX, Professeur à l'Université Paul-Sabatier de Toulouse

Assesseurs :

M. LABIE, Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

M. LAUTIE, Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Association des Elèves
ENVT

MINISTERE DE L'AGRICULTURE

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur ..... M. LAUTIE

Directeur honoraire ..... M. FLORIO

Professeurs honoraires ..... MM. BRIZARD
SAURAT

PERSONNEL ENSEIGNANT

CHAIRE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE

Professeur titulaire ..... M. GODFRAIN
Professeur sans chaire ..... Mme BURGAT-SACAZE

Pharmacie et Toxicologie

CHAIRE DE PHYSIQUE ET CHIMIE BIOLOGIQUES ET MEDICALES

Professeur titulaire ..... MM. RICO
Professeur sans chaire ..... BRAUN
Maître-Assistant ..... BENARD

Physique biologique et médicale
Chimie biologique et médicale
Informatique biologique et médicale

CHAIRE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES

Professeur titulaire ..... MM. PAVAUX
Maître-Assistant ..... LIGNEREUX
Maître-Assistant ..... SAUTET

Organogénèse - Tératologie
Anatomie générale - Anatomie appliquée

CHAIRE DE PHYSIOLOGIE, PHARMACODYNAMIE ET THERAPEUTIQUE

Professeur titulaire ..... MM. RUCHEBUSCH
Professeur sans chaire ..... FARGEAS
Maître-Assistant Agrégé ..... TOUTAIN

Physiologie - Pharmacodynamie -
Thérapeutique

CHAIRE D'HISTOLOGIE - ANATOMIE PATHOLOGIQUE

Professeur titulaire ..... MM. VAN HAVERBEKE
Professeur sans chaire ..... CABANIE
Maître-Assistant agrégé ..... MAGNOL

Histologie - Embryologie
Anatomie Pathologique - Clinique

CHAIRE D'HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE

Professeur titulaire ..... MM. LABIE
Maître de Conférences ..... EECKHOUTTE
Maître Assistant Agrégé ..... Mme BENARD

Hygiène, Inspection, Contrôle et
Technologie des denrées alimentaires
d'origine animale - Clinique

CHAIRE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES

Professeur titulaire ..... MM. DORCHIES
Maître de Conférences ..... FRANC
Maître-Assistant ..... DUCOS DE LAHITTE

Zoologie appliquée - Ecologie -
Parasitologie externe - Dermatologie
Parasitologie interne - Clinique

CHAIRE DE SEMIOLOGIE ET PATHOLOGIE MEDICALE DES EQUIDES ET CARNIVORES ET DE LEGISLATION

Professeur titulaire ..... MM. LESCURE
Maître de Conférences ..... GUELFI
Maître Assistant ..... REGNIER

Sémiologie et Pathologie Médicale des Equidés et
Carnivores
Législation Vétérinaire et Déontologie
Clinique

CHAIRE DE PATHOLOGIE MEDICALE DU BETAIL ET DES ANIMAUX DE BASSE-COUR

Professeur titulaire	MM. TOURNUT
Maître de Conférences	BEZILLE
Maître Assistant	JOUGLAR

Sémiologie et Pathologie Médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour
Clinique - Consultation itinérante

CHAIRE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE

Professeur titulaire	MM. CAZIEUX
Maître de Conférences	GENEVOIS
Maître Assistant	AUTEFAGE
Maître Assistant	FAYOLLE

Propédeutique et Sémiologie chirurgicale
Radiologie - Technique chirurgicale -
Anesthésiologie - Pathologie chirurgicale
Traumatologie - Podologie orthopédique -
Clinique

CHAIRE DE PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION

Professeur titulaire	MM. FERNEY
Professeur sans chaire	ROYAL

Pathologie de l'appareil génital et de la mamelle -
Sémiologie et propédeutique -
Pathologie de la reproduction -
Obstétrique et pathologie du nouveau-né
Clinique - Consultation itinérante

CHAIRE DE MALADIES CONTAGIEUSES - ZOONOSES - LEGISLATION SANITAIRE

Professeur titulaire	MM. CHANTAL
Maître Assistant	PICAVET

Epidémiologie - Maladies contagieuses - Zoonoses -
Législation sanitaire - Clinique -

CHAIRE DE PATHOLOGIE GENERALE - MICROBIOLOGIE - IMMUNOLOGIE

Professeur titulaire	MM. LAUTIE
Maître Assistant	PELLERIN
Maître Assistant	MILON

Microbiologie - Immunologie -
Pathologie générale

CHAIRE D'ELEVAGE ET ECONOMIE

Professeur titulaire	MM. QUEINNEC
Professeur sans chaire	DARRE
Maître-Assistant	Mme QUEINNEC

Ethnologie - Génétique animale - Extérieur -
Zootechnie et économie générales
Ethologie appliquée, Sciences, Techniques,
Economie de l'Elevage et des Productions animales -
Insémination artificielle -
Organisation de l'Elevage -

CHAIRE D'ALIMENTATION

Professeur titulaire	MM. FALIU
Professeur sans chaire	GRIESS
Maître Assistant	ENJALBERT

Botanique appliquée et bromatologie
Agronomie - Alimentation

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

MM. les Professeurs ANGELIER, ARMENGAUD, COMBES, COMBRET, CROS, FERNET et MAZENC.

La Faculté et l'Ecole déclarent n'être pas responsables des opinions émises par les candidats (délibération de la Faculté en date du 10 mai 1891 et du Conseil de l'Ecole en date du 13 juin 1924).

A MON PERE ET MA MERE,

Qu'ils trouvent ici le témoignage de mon affection et la modeste récompense des sacrifices qu'ils ont consentis pour moi.

A MON FRERE,

A MES SOEURS.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

A MONSIEUR LE PROFESSEUR ROUX
de l'Université Paul Sabatier de Toulouse

Qui nous a fait le très grand honneur de présider notre jury de thèse.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de nos sentiments de profonde gratitude.

A NOTRE JURY DE THESE

A MONSIEUR LE PROFESSEUR LABIE

de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Qui nous a fait le très grand honneur de nous confier ce travail.

Nous souhaitons qu'il trouve ici le témoignage de notre profonde estime et l'assurance de notre sincère reconnaissance.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR LAUTIE

de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Qui nous a fait le très grand honneur de participer à notre jury de thèse.

Nous lui adressons l'expression de nos hommages les plus respectueux.

LES METHODES SEROLOGIQUES POUR LA RECHERCHE DES SUBSTANCES ETRANGERES DANS LES DENREES ANIMALES OU D'ORIGINE ANIMALE

P L A N

INTRODUCTION

Première Partie :
RAPPELS SUR LA RÉACTION ANTIGÈNE-ANTICORPS

I) BASES DE LA REACTION ANTIGENE-ANTICORPS

1) Complémentarité des structures
2) Nature des forces intervenant dans la réaction
3) Mécanisme de la réaction

II) CONSEQUENCES

1) Spécificité de la réaction immunologique
2) Notion de zone d'équivalence
3) Influence des conditions physico-chimiques

Deuxième Partie :
LA PRÉPARATION DES RÉACTIFS

I) LA PREPARATION DE L'IMMUNSERUM

A) La solution d'antigène destinée à l'immunisation

1) La nature des antigènes

a) pour la recherche de protéines de viande
b) pour la recherche de protéines végétales
c) pour la recherche de protéines de lait

2) Le traitement des antigènes

a) immunisation avec du matériel natif
b) immunisation avec du matériel chauffé

B) L'obtention du sérum anti

1) Le choix de l'animal producteur
2) Le mode d'immunisation
3) L'utilisation de substances adjuvantes
4) La récolte du sérum

C) Les contrôles et les traitements du sérum anti

1) La spécificité du sérum anti
2) L'activité du sérum anti
3) La conservation du sérum anti

II) LA PREPARATION DES ECHANTILLONS A ANALYSER

A) La solubilisation des protéines

1) L'extraction par un solvant
2) La lyophilisation
3) Standardisation

B) La pureté de l'extrait

Troisième Partie :

MÉTHODES ANALYTIQUES UTILISANT LA RÉACTION ANTIGÈNE-ANTICORPS

MÉTHODES BASEES SUR UNE RÉACTION DE PRÉCIPITATION

I) LA PRECIPITATION EN MILIEU LIQUIDE

A) La technique de la superposition des solutions

1) Aspect qualitatif : le test de l'anneau
2) Aspect quantitatif : la recherche de la proportion optimale

B) La technique du mélange des solutions

II) LA PRECIPITATION EN MILIEU GELIFIE

A) Les techniques de diffusion simple

1) L'immunodiffusion radiale
2) L'électro-immunodiffusion
3) L'électro-immunodiffusion bi-dimensionnelle

B) Les techniques de diffusion double

1) La double immunodiffusion
2) L'immuno-électrophorèse
3) L'immunodiffusion verticale

MÉTHODES BASÉES SUR UNE RÉACTION D'AGGLUTINATION

I) L'HEMAGGLUTINATION INDIRECTE

1) Principe et mécanisme
2) Préparation des globules rouges
3) Préparation du sérum anti
4) Conduite de l'hémagglutination indirecte
5) Lecture et interprétation de la réaction.

II) L'AGGLUTINATION DE PARTICULES DE LATEX

MÉTHODES BASÉES SUR LE MARQUAGE D'UN RÉACTIF IMMUNOLOGIQUE

I) L'IMMUNOFLUORESCENCE

II) LES METHODES RADIO-IMMUNOLOGIQUES

III) LES METHODES IMMUNOENZYMATIQUES

LA FIXATION DU COMPLÉMENT

Quatrième Partie :

ETUDE CRITIQUE DES MÉTHODES SÉROLOGIQUES UTILISÉES DANS LE CONTRÔLE DES DENRÉES ANIMALES OU D'ORIGINE ANIMALE

I) CHAMP D'APPLICATION DES METHODES SEROLOGIQUES

II) CRITERES DE VALIDITE DES METHODES SEROLOGIQUES

1) Spécificité
2) Sensibilité
3) Précision
4) Fiabilité

III) OBSERVATIONS SUR QUELQUES EXEMPLES D'ACTUALITE

1) La détection de la fraude du lait de chèvre par du lait de vache

2) La recherche de protéines végétales incorporées aux produits carnés

3) La recherche de résidus de substances toxiques dans les aliments d'origine animale

CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE.

INTRODUCTION

Autrefois qualifiées de biologiques, puisque faisant appel à des produits élaborés par des animaux, les méthodes sérologiques constituent un procédé d'investigation indispensable pour déterminer avec certitude l'origine des protéines entrant dans la composition d'une denrée alimentaire et découvrir entre autres les fraudes résultant de l'incorporation de protéines de faible prix (protéines végétales, lacto-protéines) dans des préparations carnées de haute valeur marchande.

La mise en oeuvre de telles méthodes comporte toujours deux temps :

- tout d'abord, la préparation d'un immunsérum, ou sérumanti, contenant des substances spécifiques : les anticorps, synthétisés par des animaux en réponse à l'injection de substances étrangères à leur organisme, les antigènes,
- puis, la conduite de la réaction immunologique spécifique qui intervient lors de la mise en présence des antigènes et des anticorps correspondants.

C'est UHLENHUTH qui, au début de ce siècle, émit l'hypothèse que les techniques sérologiques pouvaient servir à la différenciation des viandes, alors que jusque là elles n'avaient été employées que dans le diagnostic des maladies. A son instar, de nombreux chercheurs ont alors exploré cette nouvelle voie et parmi eux, VALLEE, NICOLAS, GAUGOUX, CESARI en France.

Mais la difficulté d'obtenir régulièrement des immunsérums actifs et spécifiques, l'insuffisance de rigueur et de fidélité des méthodes préconisées, l'absence d'indications concernant leur sensibilité et le degré d'approximation des résultats ont été cause d'une stagnation des recherches.

En revanche, dans la deuxième moitié de ce siècle, les chercheurs se sont attachés à améliorer les possibilités de mise en évidence de protéines étrangères aux aliments permises par ces méthodes sérologiques, à standardiser les différentes étapes de leur conduite, à déterminer leur fiabilité et leurs limites. Ne mentionnons à ce propos que les importants travaux réalisés en Allemagne par SINELL et ses collaborateurs à Berlin, par KOTTER, HERRMANN et leurs collaborateurs à Munich.

Ce sont ces recherches, publiées au cours des vingt dernières années, que nous avons étudiées afin de réaliser le présent travail conçu en quatre parties : la première est un rappel des notions immunologiques fondamentales qui justifient le caractère très méticuleux à apporter dans la mise en oeuvre des techniques envisagées plus loin et qui révèlent les limites à respecter dans l'interprétation des résultats ; la deuxième présente la préparation des réactifs, à savoir le sérum anti et l'échantillon à analyser, qui constitue le préalable commun à toute analyse sérologique; la troisième répertorie et décrit les diverses méthodes sérologiques ayant été employées en analyse alimentaire; enfin la quatrième partie essaie de dégager les avantages que l'on peut accorder à ces méthodes, notamment en matière de sensibilité et de fiabilité.

Première Partie

RAPPELS SUR LA REACTION ANTIGENE-ANTICORPS

I) *BASES DE LA REACTION ANTIGENE-ANTICORPS*

1) *Complémentarité des structures*

Les antigènes, substances hétérologues pour l'organisme receveur, sont généralement de nature polysaccharidique ou protéique. Ils possèdent donc une constitution chimique et une structure stéréochimique bien définies. Mais ce sont des zones restreintes de la molécule, les " déterminants antigéniques " , qui traduisent leur spécificité.

Ces antigènes provoquent dans l'organisme receveur la synthèse de protéines spécifiques, les immunoglobulines, dont la structure moléculaire présente des zones de taille réduite, les " sites anticorps ", qui leur confèrent une configuration spatiale complémentaire de celle de l'antigène homologue.

2) *Nature des forces intervenant dans la réaction*

La combinaison antigène-anticorps survient lorsque les " sites anticorps " et les " déterminants antigéniques " sont très proches.

L'intervention de forces électrostatiques, de liaisons hydrogène, de liaisons hydrophobes et de forces de Van der Waals établit des liaisons non covalentes. Ce sont des liaisons faibles, très dépendantes de la distance intermoléculaire et de l'adaptation des structures spatiales de l'antigène et de l'anticorps l'un par rapport à l'autre.

3) Mécanisme de la réaction

Cette combinaison, toujours réversible, représente la phase immunologique proprement dite de la réaction antigène-anticorps. Elle aboutit à la constitution d'un réseau soluble d'immuncomplexes. L'étape suivante est purement physico-chimique, donc non spécifique; elle consiste en la formation d'agrégats insolubles qui rendent la réaction antigène-anticorps macroscopiquement visible.

II) CONSEQUENCES

1) Spécificité de la réaction immunologique

Elle est directement liée à l'étroite complémentarité des structures de l'antigène et de l'anticorps homologue.

La connaissance des bases moléculaires de la réaction antigène-anticorps fournit l'explication de certaines défaillances apparentes de spécificité :

- des substances d'origine différente mais possédant des déterminants antigéniques communs réagissent avec des anticorps fabriqués contre l'une d'entre elles; on parle alors de " réactions croisées ".
- la dénaturation d'une substance par un traitement physico-chimique peut modifier la nature d'un groupement déterminant et entraîner une perte de spécificité, ou éventuellement l'acquisition d'une spécificité nouvelle. En outre, cette spécificité n'est pas absolue car la flexibilité de la structure de l'anticorps permet, dans une certaine mesure,

une réaction avec les déterminants d'une protéine hétérologue ou, plus facilement, avec des substances chimiques simples telles que certains glucides.

2) Notion de zone d'équivalence

La formation de complexes antigène-anticorps reliés en réseau n'apparaît que pour des proportions optimales d'antigène et d'anticorps, lesquelles définissent une zone d'équivalence. L'une de ces proportions favorise une réaction immunologique de vitesse et d'intensité maximales.

En dehors de cette zone, il existe un excès d'anticorps ou d'antigène et les complexes formés restent solubles car isolés, du fait de l'insuffisance de molécules d'antigène ou d'anticorps pour réaliser des ponts entre eux.

3) Influence des conditions physico-chimiques du milieu

La diminution ou l'augmentation du pH ou de la molarité des tampons entraîne la dissociation du complexe antigène-anticorps. Il est donc important de maintenir le pH du milieu de réaction à une valeur stable, voisine de la neutralité ou tout au moins comprise entre 4 et 10,5.

La température intervient en modifiant la vitesse de la réaction antigène-anticorps; elle est ainsi plus grande à 37°C qu'à 4°C.

Deuxième Partie

LA PREPARATION DES REACTIFS

I) LA PREPARATION DE L'IMMUNSERUM

A) LA SOLUTION D'ANTIGENE DESTINEE A L'IMMUNISATION

Afin de garantir la spécificité du test sérologique, l'antigène utilisé pour l'immunisation doit posséder une structure très proche de celle de la protéine à rechercher. C'est pourquoi non seulement il est choisi selon la nature de cette dernière , mais, en outre, il est soumis à un traitement physico-chimique dont les conséquences sont analogues à celles résultant du traitement subi par la denrée à analyser.

Il est préférable de se servir d'une solution d'antigène purifiée plutôt que d'un produit brut car, pour une détermination sérologique quantitative, l'appréciation de la réaction n'est fiable qu'avec un sérum anti-monospécifique, c'est-à-dire ne contenant qu'un seul type d'anticorps. Après sa mise en solution, il sera donc éventuellement procédé à un fractionnement plus ou moins poussé de l'antigène.

1) La nature des antigènes

a) pour la recherche des protéines de viande

- protéines sériques.

L'utilisation de sérum sanguin dans le dessein de mettre en

évidence la spécificité d'origine d'un produit carné est classique.

Son obtention est simple puisqu'il suffit de laisser coaguler du sang fraîchement recueilli, puis de le centrifuger et de récupérer le surnageant. L'immunisation avec celui-là procure un sérum anti actif, bien qu'à un titre très bas, vis-à-vis d'extraits musculaires homologues. Nombreuses ont été les recherches menées avec de tels sérums; cependant WARNECKE considère que la réaction manifestée dans ses expériences n'est pas assez forte pour préconiser l'emploi de ces protéines sériques en tant que matériel d'immunisation.

Il existe dans un sérum sanguin intégral de nombreux types de protéines, ayant chacun un degré variable de spécificité d'espèce. Aussi, pour éviter certains échecs, KARPAS préfère-t-il recourir à une solution d'immunoglobulines G partiellement purifiée, qu'il prépare de la façon suivante : le sérum sanguin de l'espèce animale à tester est recueilli et précipité trois fois à l'aide d'une solution saturée de sulfate d'ammonium. Le précipité est dissous dans une solution physiologique de chlorure de sodium, pour être soumis à une dialyse puis à une chromatographie sous contrôle spectrophotométrique en lumière ultra-violette. Les immunoglobulines G collectées à une longueur d'onde de 280 nanomètres sont concentrées par ultrafiltration sous pression.

- protéines musculaires

La seule macération de morceaux de viande dans un soluté physiologique salé ne permet de récupérer que les restes de sang contenus dans les muscles, ce qui n'est pas compatible avec la préparation d'un sérum anti efficace.

L'extraction des protéines sarcoplasmiques est facilement réalisée par un broyage poussé de la viande, suivi d'une homogénéisation en présence de soluté physiologique salé. SINELL complète ce procédé en séparant les protéines obtenues par une filtration sur gel ou par une électrophorèse. Il recueille alors deux fractions : la fraction F_1,

assimilable en grande partie aux séro-albumines, réagit avec un sérum anti-protéines sériques homologues et elle possède une spécificité d'espèce; la fraction F_2, contenant, en particulier, la myoglobine, ne réagit pas avec le sérum précédent et présente des antigènes communs à plusieurs espèces animales.

WARNECKE obtient de meilleurs résultats avec un immunsérum préparé à partir d'un extrait musculaire aqueux lyophilisé au lieu de sérum sanguin. Quant aux protéines fibrillaires, leur solubilité est très faible. Malgré tout, WARNECKE réussit à les extraire du muscle grâce à une solution de chlorure de potassium. Mais, pour obtenir une fabrication satisfaisante d'anticorps, il est obligé d'injecter aux animaux, comparativement aux protéines sériques ou sarcoplasmiques, de grandes quantités de matériel, ce qui provoque de nombreuses réactions d'anaphylaxie. De surcroît le sérum anti produit ne présente pas une spécificité et une activité suffisantes pour être valablement utilisé dans la détection des différences d'espèces.

- antigène de Forssmann

Cet antigène de nature lipoïdique, encore appelé antigène F, a été découvert par FORSSMANN en 1911, au niveau des globules rouges du mouton. Présent également dans les muscles et surtout dans les organes de certaines espèces, parmi lesquelles le cheval, il est par contre absent chez d'autres, comme le boeuf et le porc.

Sa mise en évidence, selon la réaction de Sachs et Georgi, est compliquée. Malgré cela, ayant l'avantage d'être thermostable, il fut souvent utilisé, notamment par CESARI, pour la détection des fraudes dans les produits de charcuterie cuits.

L'extraction de l'antigène de Forssmann se fait par l'alcool fort. D'après BONNAND, le sérum anti obtenu permet bien de déceler l'incorporation d'intestins ou de poumons de cheval dans un produit, mais son efficacité est beaucoup moins bonne pour la recherche de viande de cheval proprement dite.

b) pour la recherche des protéines végétales

Les protéines végétales présentent un intérêt en tant qu'adjuvants de fabrication des produits carnés transformés; mais elles peuvent de plus en plus, c'est le cas du soja par exemple, remplacer les protéines d'origine animale entrant dans la constitution de ces denrées.

D'excellents immuns sérums pour la détection de telles protéines peuvent être élaborés , grâce aux préparations antigéniques du commerce.

Cependant, pour la mise en évidence de protéines végétales encore peu utilisées pour le moment (fèverolle, tournesol), une extraction de celles-ci peut être réalisée par la macération, dans un soluté physiologique salé, des végétaux correspondants ; comme le précise BAUDNER, ces végétaux doivent être choisis à maturité car un même végétal comporte en fait plusieurs types de protéines dont la proportion varie selon le moment de la récolte et modifie la spécificité du sérum anti.

c) pour la recherche des protéines du lait

Des préparations de lactoprotéines sont disponibles dans le commerce, car elles sont fréquemment utilisées comme liants dans les produits de charcuterie. En ce qui concerne la recherche des lactoprotéines solubles, HANSON immunise des lapins directement avec du lait; mais comme le lait contient aussi des protéines identiques aux protéines sanguines, le sérum obtenu dans ces conditions doit être traité avec des protéines sériques homologues afin d'améliorer sa spécificité.

Pour détecter l'adultération de lait de chèvre par du lait de vache, LEVIEUX préconise l'utilisation, comme antigène, de colostrum bovin ou mieux d'immunoglobulines G_1 bovines. L'obtention et la purification de ces immunoglobulines ne posent pas de problèmes particuliers, étant donné leur présence en assez grande quantité dans le colostrum de vache. Le choix de ce type de protéines découle des critères suivants : contrairement à la caséine, la structure antigénique des immunoglobulines G_1 n'est pas modifiée

lors de la transformation de lait en fromage ; par ailleurs la β-lacto-globuline et l'α-lactalbumine ont un plus faible pouvoir antigénique que la fraction G_1 des immunoglobulines et l'immunisation répétée avec ces protéines là aboutit à une perte de spécificité du sérum anti.

2) Le traitement des antigènes

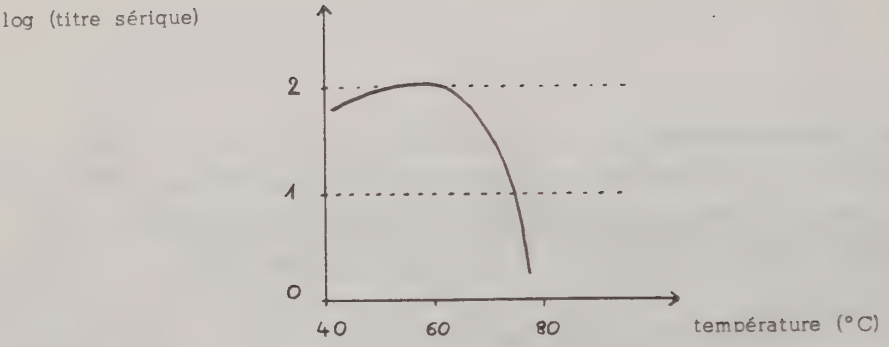
a) immunisation avec du matériel natif

Le sérum fabriqué avec des protéines natives s'avère très actif bien que peu spécifique ; il ne permet de détecter que des protéines n'ayant pas subi de chauffage important. Les produits soumis lors de leur préparation à une température à coeur supérieure à 70°C ne peuvent être analysés à l'aide de tels sérums.

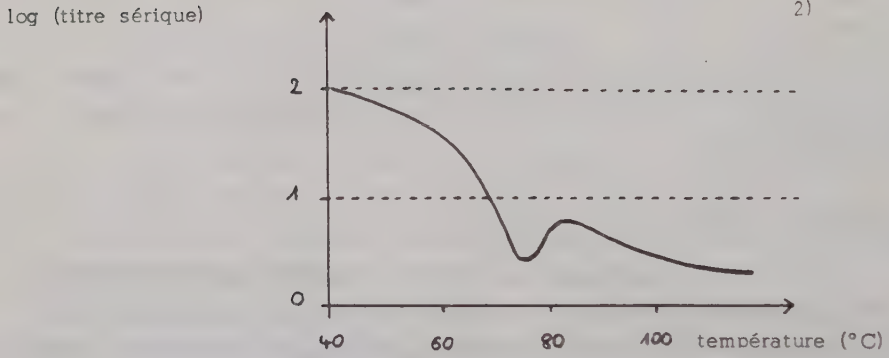
b) immunisation avec du matériel chauffé

L'emploi de protéines préalablement chauffées permet d'obtenir, après immunisation des animaux, un sérum susceptible de réagir avec des protéines ayant subi un traitement thermique beaucoup plus sévère, pouvant atteindre 120°C comme c'est le cas pour les conserves. Ce sérum ne perd nullement son aptitude à révéler des protéines natives. Malgré tout, son pouvoir anticorps apparaît plus faible que celui d'un sérum anti-protéines natives. La plupart des auteurs soumettent la solution d'antigène à un simple chauffage à 70-75°C pendant 30 minutes. SINELL a établi des courbes démontrant la supériorité d'un sérum fabriqué par immunisation avec de tels thermoantigènes sur un sérum anti-antigènes natifs. Elles représentent la variation du titre sérique en fonction de la température à laquelle l'antigène a été porté dans la denrée à analyser ; la remontée du graphe numéro 2 est à rattacher à une meilleure extraction protéique à partir du produit à tester, grâce à sa lyophilisation préalable. Les thermo-antigènes ont été également lyophilisés et mis en solution seulement au moment de l'immunisation.

1)



2)



d'après SINELL

mise en évidence des protéines d'une denrée en fonction de la température subie à coeur lors de sa fabrication à l'aide :

- d'un sérum anti-protéines natives 1)
- d'un sérum anti-protéines chauffées 2)

KOTTER et HERRMANN préparent leurs antigènes par chauffage puis traitement par une base, selon la méthode de Schmidt ("Hitze-Alkali-Präzipitation ") : l'extrait protéique est soumis à un premier chauffage à 70°C pendant 30 minutes, à la suite de quoi il est aussitôt mélangé à une solution de soude 1 N; après neutralisation par une solution d'acide chlorhydrique 1 N, il est procédé à un second chauffage dans l'étuve à 70°C pendant 15 minutes. Les protéines sont bien entendu remises en solution pour l'immunisation.

B) L'OBTENTION DU SERUM ANTI

1) Le choix de l'animal producteur

Du fait de sa facilité d'entretien en laboratoire, le lapin représente l'espèce animale la plus appropriée pour produire une grande quantité de sérum anti. La race et le sexe n'exercent aucune influence sur la production d'anticorps; le plus souvent, ce sont des animaux bâtards de sexe mâle qui ont été utilisés.

Le poids, et ainsi l'âge des animaux, est plus important à considérer. Dans la majorité des cas, les chercheurs ont fait appel à des animaux de deux et demi à trois kilogrammes. Cependant KRUGER a montré par ses travaux que des lapins de cinq kilogrammes sont préférables car ils supportent bien mieux le stress des injections et produisent, en outre, un sérum au titre d'anticorps plus élevé.

Des pertes intercurrentes n'étant pas exclues, il est recommandé de procéder à l'immunisation simultanée de plusieurs animaux ; mais, comme il existe des variations individuelles considérables du titre sérique, il convient de ne prendre qu'un seul donneur pour une même série d'expériences.

2) Le mode d'immunisation

Les protocoles d'immunisation sont extrêmement nombreux et variés. Quelques règles concernant la voie d'introduction et la dose d'antigène sont à respecter :

- l'antigène doit être administré sous forme de solution, par voie parentérale. Les voies intra-musculaire et sous-cutanée sont plus indiquées lors de l'injection de grandes quantités de substances. KOTTER, HERRMANN, DEGENKOLB, HINGERLE, KRUGER, GROSSKLAUSS, BESSEMAN, LAMBION pratiquent une immunisation par voie sous-cutanée; SINELL, KLUGE-WILM, MENTZ combinent des injections intradermiques et intraveineuses; WARNECKE, SAFFLE utilisent la voie intra-musculaire.

- plus que la dose totale d'antigène à apporter, l'important est son fractionnement en quantités modérées, qui sont injectées à de courts intervalles de temps les unes des autres. Ainsi, KOTTER, DEGENKOLB,pour de grosses quantités d'antigène (quinze grammes par animal) administrent quinze doses isolées à deux jours d'intervalle. Pour de plus petites doses totales, SINELL,KLUGE-WILM immunisent l'animal par injection de quatre doses isolées à des intervalles de trois jours; WARNECKE, SAFFLE réalisent quatre injections à deux jours d'intervalle suivies dix jours après par deux autres injections à deux jours d'intervalle ou bien, selon un autre protocole, deux injections à deux jours de distance puis, après un repos de vingt deux jours, deux nouvelles injections suivies également d'un repos de vingt et un jours avant la saignée.

3) L'utilisation de substances adjuvantes

Elle permet de stimuler la production d'anticorps. Deux catégories de substances sont employées.

Les sels métalliques, parmi lesquels sont à citer l'hydroxyde d'aluminium et le chlorure ferrique, provoqueraient par leur adsorption

un accroissement de volume de la molécule d'antigène, ce qui augmenterait son immunogénicité ; c'est en fait leur effet catalytique qui est prédominant. HERRMANN, RING, CORSICO, KOTTER ont montré que l'injection sous-cutanée d'antigène et d'adjuvant associés ou l'injection sous-cutanée d'antigène pur puis celle de l'adjuvant par voie intraveineuse possèdent la même efficacité; par contre, leur injection sous-cutanée séparément est inopérante sur le plan de l'immunostimulation.

Les substances organiques telles que les polysaccharides, les huiles, les matières grasses synthétiques, l'adjuvant de Freund complet ou incomplet, agissent selon un mécanisme différent; elles entraînent au lieu d'injection la formation d'un granulome où s'accumulent les cellules impliquées dans la réponse immunitaire. Un inconvénient de ces substances, en particulier de l'adjuvant de Freund complet, serait pour KARPAS d'augmenter concomitamment l'antigénicité de composants mineurs, d'impuretés, présents dans la solution d'antigène, d'où la production de sérum anti moins spécifique et en conséquence l'apparition d'un plus grand nombre de réactions croisées lors des tests.

4) La récolte du sérum

Le moment de la saignée est variable suivant le protocole retenu pour l'immunisation. Elle s'effectue plusieurs jours après la dernière injection d'antigène, soit par ponction cardiaque, soit par ponction de la veine marginale de l'oreille. Le sang recueilli est placé une nuit au réfrigérateur et le sérum surnageant est récupéré le lendemain après centrifugation.

C) LES CONTROLES ET LES TRAITEMENTS DU SERUM ANTI

Les contrôles de spécificité et d'activité du sérum anti conditionnent directement la valeur de l'épreuve sérologique, en particulier pour une détermination quantitative.

1) La spécificité du sérum anti

Elle est testée par précipitation du sérum avec des extraits protéiques hétérologues, selon la méthode d'Ouchterlony de double diffusion en milieu gélifié, exposée plus loin. KAMIYAMA purifie le sérum anti par chromatographie, ce qui a pour effet de séparer certains anticorps indésirables et de diminuer les réactions non spécifiques observées avec des extraits bruts de denrée.

Mais l'immuno-absorption est indispensable pour l'obtention d'un sérum anti véritablement monospécifique. Elle consiste à faire réagir l'immun sérum avec la protéine purifiée de l'extrait hétérologue responsable d'une réaction croisée lors du test de spécificité. Pour cela MANZ place le mélange à 37°C pendant 30 minutes puis à 48°C pendant 3 ou 4 heures; le sérum est récupéré après une centrifugation de 20 minutes à 2 000 g. L'opération est répétée, habituellement au plus trois fois, jusqu'à ce que les tests de précipitation avec les protéines hétérologues soient négatifs. Cette absorption est éventuellement poursuivie avec les protéines pour lesquelles des réactions croisées de moindre importance ont pu être également détectées.

Dans le cas d'une réactivité croisée extrêmement marquée concernant des protéines d'espèces animales différentes mais par ailleurs étroitement apparentées, l'immunisation croisée entre ces deux espèces pourrait être, selon KARPAS, une méthode bien supérieure pour produire un sérum monospécifique tout en assurant la formation d'anticorps à un taux élevé.

LEVIEUX en immunisant des chèvres avec des immunoglobulines bovines en vue de détecter avec le sérum recueilli les adultérations de laits de chèvres, a confirmé l'efficacité de ce procédé.

2) L'activité du sérum anti

Elle est déterminée par titrage du sérum avec une préparation de référence. Le titre sérique correspond à la plus haute dilution de sérum qui donne une réaction visible pour une quantité constante d'antigène. La méthode de titrage la plus souvent employée est celle de la précipitation en milieu liquide, également décrite plus loin.

Le choix d'un titre sérique minimal doit être effectué avant la mise en route des analyses, de telle manière que l'interprétation des réactions soit faisable et cela avec précision.

Il est possible de réaliser la mesure du pouvoir anticorps au cours de la période d'immunisation, afin d'en suivre l'évolution et de déterminer le moment le plus propice pour la saignée.

3) La conservation du sérum anti

Le sérum recueilli contient des substances labiles, telles que les lipoprotéines; il est donc nécessaire de le stabiliser. La lyophilisation, la congélation sont divers procédés qui permettent la bonne conservation de ses propriétés pendant plusieurs mois, sous réserve de respecter certaines conditions, notamment la mise à l'abri de la lumière.

I) *LA PREPARATION DES ECHANTILLONS A ANALYSER*

) LA SOLUBILISATION DES PROTEINES

Généralement, les réactions sérologiques sont réalisées avec des tigènes et des anticorps en solution. Cela exige donc d'extraire, de lubiliser les protéines contenues dans la denrée à analyser. C'est d'ailleurs en dans cette difficulté de les mettre en solution que réside l'écueil sentiel rencontré lors de la recherche, par des méthodes sérologiques, des otéines chauffées à haute température, et non dans une modification de ur capacité à produire des réactions immunologiques.

1) L'extraction par un solvant

Un prélèvement de la denrée à analyser, finement haché, est s à macérer dans une quantité déterminée de milieu d'extraction, pendant ne durée et à une température données. La nature du milieu d'extraction t variable. L'eau distillée a rapidement laissé la place au soluté ysiologique de chlorure de sodium qui a été retenu par de nombreux hercheurs dont FROMM, KOTTER, HERRMANN, WARNECKE...D'autres comme GUNTHER, RIGK,STUTZ-BAASCH ont utilisé efficacement des solutions de barbiturates. NELL,quant à lui, a montré le pouvoir restaurant (" renaturant ") d'une olution d'urée 8 M vis-à-vis des protéines coagulées par la chaleur.

A la suite de cela, l'extrait est centrifugé puis, après imination de la matière grasse, le surnageant opalescent est recueilli our être utilisé dans le test sérologique.

On peut s'assurer de l'efficacité de l'extraction par le recours une réaction au biuret ou à l'acide nitrique.

2) La lyophilisation

Ni l'augmentation de la quantité de solvant, ni la prolongation de la durée d'extraction n'améliorent la mise en solution des protéines coagulées par chauffage. Par contre, selon l'explication de SINELL, les protéines lyophilisées forment un réseau à mailles fines qui accroît leur surface et permet ainsi leur solubilisation dans des conditions optimales. C'est pourquoi il est bon, surtout dans le cas d'un produit chauffé, de procéder à la lyophilisation de cette denrée, préalablement à l'extraction.

3) Standardisation

Même si la méthode d'extraction est optimale, il n'est pas possible d'extraire les protéines d'un produit carné dans leur totalité; tout au plus 90 pour cent selon KOTTER, HERRMANN, MERKLE.

L'appréciation quantitative d'une réaction sérologique fait appel, pour cette raison, à une courbe d'étalonnage établie à partir d'un produit de composition connue; il est alors possible de passer d'une teneur relative à une teneur absolue. Mais cela implique une standardisation de la méthode d'extraction, ce que proposent GERIGK et KRUGER : 20 grammes de matériel sont prélevés au coeur de la denrée puis soumis à un hachage ; 10 grammes sont recueillis dans une boîte de Pétri pour être lyophilisés. Le lyophilisat est placé dans un tube à centrifuger avec cinq fois son poids de milieu d'extraction, consistant en un tampon véronal (1,842 g de barbital ; 10,309 g de barbitate de sodium; 4,102 g d'acétate de sodium ; eau distillée q.s. pour 100 ml). Le mélange est centrifugé pour homogénéisation puis l'extraction se fait à la température de la pièce pendant au moins deux heures. Enfin, après une centrifugation de 10 minutes à 2 000 g, l'extrait est aspiré à l'aide d'une pipette, la couche de matières grasses ayant été éliminée.

B) LA PURETE DE L'EXTRAIT

Le fait que le matériel à analyser soit dégraissé ou non n'interient pas dans la réaction sérologique. Cependant, afin de faciliter la ecture dans le cas d'une précipitation en milieu liquide, où les solutions tilisées doivent être parfaitement limpides, SINELL traite le lyophilisat ar l'éther de pétrole avant l'extraction des protéines.

SINELL a, en outre, mis en évidence une différence de deux egrés de dilution dans les résultats à cause de la présence de condiments, 'épices.. Il soumet donc au préalable la denrée à une dialyse en présence 'eau distillée.

Troisième Partie

METHODES ANALYTIQUES UTILISANT LA REACTION ANTIGENE-ANTICORPS

LES MÉTHODES BASÉES SUR UNE RÉACTION DE PRÉCIPITATION

La précipitation est le phènomène macroscopiquement visible de l'agrégation de particules insolubles; elle traduit la formation d'immuns complexes résultant de la réaction qui intervient lorsque des antigènes et des anticorps homologues sont mis en présence les uns des autres dans des proportions convenables. Les antigènes et les anticorps sont présentés en solution aqueuse, à savoir l'extrait de la denrée douteuse et le sérum préparé contre la protéine à déceler. La réaction de précipitation peut être menée selon deux modalités : soit en phase liquide, où la réaction survient dans un tube sans intermédiaire entre les solutions d'antigènes et d'anticorps, soit en phase solide, où les deux solutions sont amenées à se rencontrer et à réagir dans un milieu gélifié disposé dans un tube, une boîte ou sur une lame. Cette seconde modalité a fait l'objet de nombreux aménagements permettant une meilleure révélation de la réaction.

I) LA PRECIPITATION EN MILIEU LIQUIDE

) LA TECHNIQUE DE LA SUPERPOSITION DES SOLUTIONS

1) Aspect qualitatif : le test de l'anneau

La méthode fut mise au point par UHLENHUTH, qui envisagea ailleurs son application en analyse alimentaire pour le dépistage des raudes dans les produits de charcuterie. Ce test, connu autrefois sous le om de " réaction de Vallée et Nicolas ", est fondé sur le principe suivant: n superpose dans un tube capillaire la solution contenant les anticorps et elle contenant les antigènes ; il se forme un précipité en forme d'anneau l'interface. C'est le test de l'anneau, encore appelé ring-test.

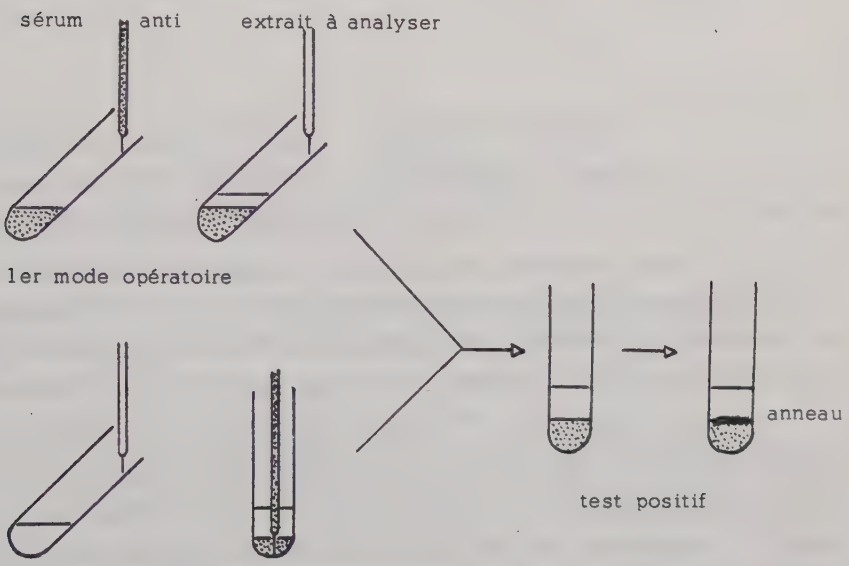
La technique consiste à former deux couches bien distinctes, oit en déposant la solution d'antigène au-dessus du sérum anti, soit en éposant le sérum, grâce à une pipette capillaire, au fond du tube contenant éjà la solution d'antigène qui se trouve alors soulevée par celui-là. Dans es deux cas il importe de manipuler avec précaution, en assurant un écoule- ent lent des solutions, afin d'éviter leur dilution l'une dans l'autre. Bien videmment des pipettes différentes doivent être utilisées pour chacune 'elles.

La lecture de la réaction se fait après quinze à vingt minutes, ar l'examen du tube en lumière artificielle sur fond noir; la présence d'un nneau blanchâtre à la surface de séparation des solutions indique une réac- ion positive qui signifie que l'extrait de denrée à analyser contient la rotéine suspecte recherchée.

Utilisée par la plupart des auteurs, cette méthode est de mise n oeuvre extrêmement simple et permet d'obtenir rapidement une réponse.

Précipitation en milieu liquide : test de l'anneau

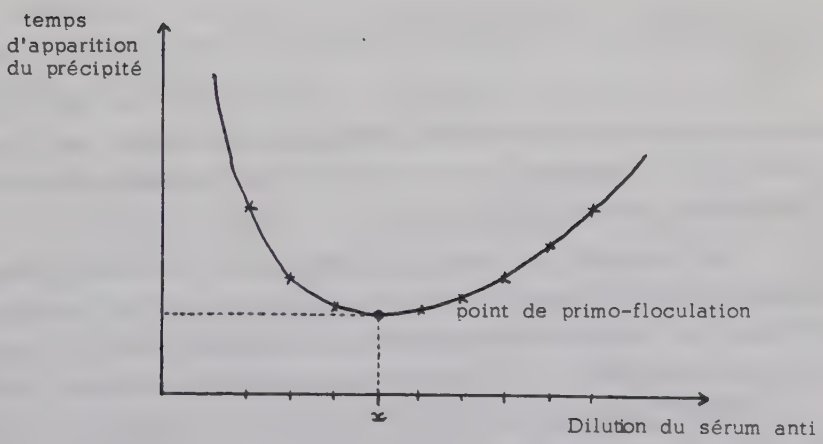
1) aspect qualitatif



1er mode opératoire

2ème mode opératoire

2) aspect quantitatif



2) Aspect quantitatif : la recherche de la proportion optimale

La vitesse d'apparition et l'intensité de la réaction sont aximales pour un rapport déterminé d'antigène et d'anticorps.

Cette proportion optimale est recherchée par la mise en route e la réaction dans une série de tubes préparés selon la dilution géométrique e l'un des deux réactifs. La valeur de la dilution pour laquelle apparaît a primo-floculation permet une estimation quantitative de la protéine visée.

Le procédé α, qui requiert une quantité fixe d'immunsérum mise à ncuber à 37°C avec des quantités croissantes d'antigène, a été le plus ouvent employé, bien qu'il consomme beaucoup plus de sérum que le procédé β . elui-ci, caractérisé par une dose constante d'antigène et des dilutions ariables d'anticorps, n'est pas utilisable car très souvent les tubes à aute dilution de sérum se trouvent dans la zone d'excès d'antigène.

Cette méthode de précipitation a surtout été retenue pour le itrage préalable du sérum anti à l'aide d'un extrait antigénique connu.

B) LA TECHNIQUE DU MELANGE DES SOLUTIONS

Les solutions d'antigène et d'anticorps sont mélangées dans le ube de façon homogène. Dans ce cas, la réaction se traduit par l'apparition 'un trouble qui s'accentue peu à peu et finit par se résoudre en flocons ui sédimentent au fond du tube.

Du fait de la meilleure visualisation de la réaction dans le test e l'anneau, cette méthode a été très peu employée pour une détection purement ualitative. A l'inverse, pour de nombreux chercheurs, elle a présenté une rande importance dans le cas d'une précipitation selon un mode quantitatif.

Signalons pour mémoire que DEGENKOLB et HINGERLE font état de 'emploi par Schultze de la technique de néphélométrie, c'est-à-dire de esure de la turbidité de la solution contenue dans les tubes par photométrie,

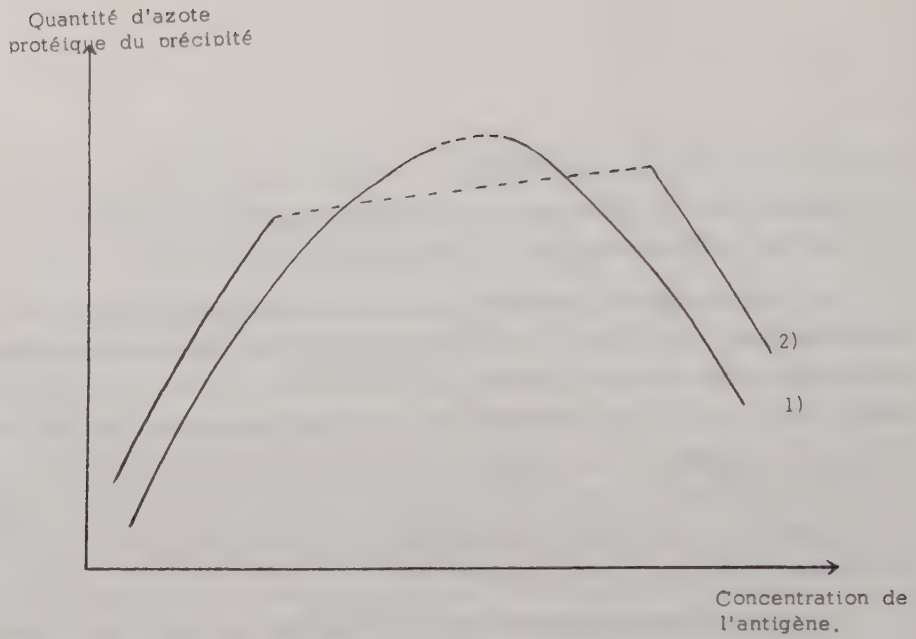
en tant que procédé d'analyse quantitative. Toutefois, le procédé principal est basé sur la sédimentation du précipité.

HEIDELBERGER et KENDALL réalisent une détermination directe gravimétrique du précipité. Les réactions sérologiques sont menées dans une galerie de tubes selon le procédé déjà envisagé plus haut. A la suite de cela, il est procédé à la centrifugation des tubes. Le culot de centrifugation, correspondant à la totalité des immuns complexes précipités, est recueilli et lavé. L'azote qu'il contient est alors dosé suivant la méthode de Kjeldahl, ce qui permet de tracer une courbe en fonction de la quantité d'antigène.

Cette courbe comporte trois zones. Dans la zone dite d'équivalence, tous les antigènes et les anticorps homologues sont présents dans le précipité; le titre sérique étant connu, il est alors possible de déterminer la concentration de la protéine recherchée dans la denrée. Quant aux autres zones, il existe aussi des antigènes et des anticorps dans le surnageant. KOTTER et HERRMANN préconisent également son analyse afin de bien préciser la courbe de précipitation quantitative et d'avoir la concentration exacte d'antigène dans le produit testé.

Cette technique, certainement très précise pour un antigène pur, s'avère longue et laboratieuse.

DEGENKOLB et KINGERLE en proposent une simplification grâce à l'utilisation de tubes gradués. Comme il existe une relation directe entre la quantité de précipité et sa hauteur dans le tube, ils tracent une courbe donnant la concentration de l'antigène en fonction de cette hauteur. Ils ont ainsi apprécié la quantité de lactoprotéines ou de protéines de soja contenues dans des produits carnés chauffés à haute température. KRUGER et GROSSKLAUS ont obtenu avec cette même méthode de moins bons résultats.



Courbes de précipitation quantitative

1) cas d'un sérum anti préparé chez le lapin

2) cas d'un sérum anti préparé chez le cheval

de gauche à droite :

_____ excès d'anticorps

---------- zone d'équivalence

_____ excès d'antigène

A propos de ces déterminations quantitatives, HERRMANN, MERKLE et KOTTER remarquent que les transformations technologiques appliquées à la denrée lors de sa fabrication augmentent notablement les limites d'erreurs. Les réponses sont irrégulières et les réactions non spécifiques assez nombreuses, ce que RADAN signale par exemple en présence d'une grande quantité de polyphosphates. Ainsi, l'estimation ne peut-elle être faite qu'avec une précision de plus ou moins 2,5 pour cent, si la méthode est conduite soigneusement; en outre, cette précision est moins bonne lorsque de grandes quantités de protéines doivent être recherchées.

Rappelons également que les solutions utilisées doivent être limpides, pour que la réaction soit lisible, et qu'une appréciation quantitative réelle ne peut être effectuée que pour un seul type d'antigène, ce qui implique le recours à un sérum anti monospécifique.

II) LA PRECIPITATION EN MILIEU GELIFIE

Elle est réalisable selon deux techniques, décrites par OUDIN : soit par simple diffusion, où seul l'antigène diffuse dans un gel contenant le sérum anti, soit par double diffusion, où les solutions d'antigène et d'anticorps diffusent l'une vers l'autre.

Dans les deux cas, la concentration des réactifs au cours de leur diffusion diminue suivant un gradient et la précipitation se produit au lieu où le rapport anticorps antigène est optimal.

De manière analogue à ce qui se passe en milieu liquide pour la technique des mélanges vue précédemment, hors de la zone d'équivalence, il y a dissolution du précipité dans l'excès d'antigène, en arrière du front de diffusion, ce qui donne l'impression que la zone de précipitation avance dans le gel. Au bout d'un certain temps, cette zone se stabilise : c'est le point final (" end point ") de la réaction et le moment où il convient de lire la préparation.

La nature et la position du précipité dépendent des paramètres physico-chimiques des réactifs, ainsi que de ceux du milieu. Les zones de précipitation sont distinctes pour des antigènes différents et ces méthodes sont ainsi bien indiquées pour l'étude des mélanges d'antigènes.

Les chercheurs ont utilisé des milieux gélifiés à base d'agar ou d'acétate de cellulose. L'acétate de cellulose offre plusieurs avantages: il se trouve sous forme de feuilles toujours prêtes à l'emploi; les lignes de précipitation sont très nettes; enfin les feuilles peuvent être utilisées telles quelles pour la constitution des dossiers expérimentaux. C'est cependant l'agar que la majorité des chercheurs ont employé.

La couche d'agar est préparée sur des supports variables, en fonction de la méthode d'analyse choisie : tubes,plaques, boîtes de Pétri, lames porte-objet. Après la fin de la réaction, le précipité peut éventuellement être coloré par le noir amide, le bleu brillant, le rouge ponceau ou tout autre colorant des protéines. A la différence de la précipitation en phase liquide, des solutions troubles de réactifs sont ici utilisables.

A) LES TECHNIQUES DE DIFFUSION SIMPLE

SINELL et MENTZ proposent de préparer le milieu de diffusion selon le mode suivant : les divers constituants du gel d'agar contiennent 1 g d'agar noble, 25 ml de tampon véronal, 74 ml d'eau distillée, 1 ml de merthiolate; le gel possède un pH de 8,6 et une force ionique de 0,1. La fusion de l'agar est assurée par ébullition; le merthiolate est ajouté à ce moment, puis le mélange est refroidi à une température de 54°C par l'eau courante. La quantité requise d'une solution de sérum anti à 1,5 pour cent est alors délayée dans ce gel, très soigneusement pour que sa concentration y soit parfaitement homogène. Le gel est ensuite déposé sur les supports choisis, préalablement nettoyés et dégraissés, de manière à les recouvrir d'une couche d'épaisseur uniforme. Le gel se solidifie; sa résistance mécanique est augmentée par un

séjour d'une nuit au réfrigérateur. Des cupules sont découpées à l'aide d'un emporte-pièce adéquat et débouchées par une pompe à succion d'eau, juste avant la manipulation.

1) L'immunodiffusion radiale

Elle a été mise au point par MANCINI en 1965. Les extraits protéiques à analyser sont déposés dans des puits cylindriques disposés en cercle, à partir desquels se fait une diffusion centrifuge.

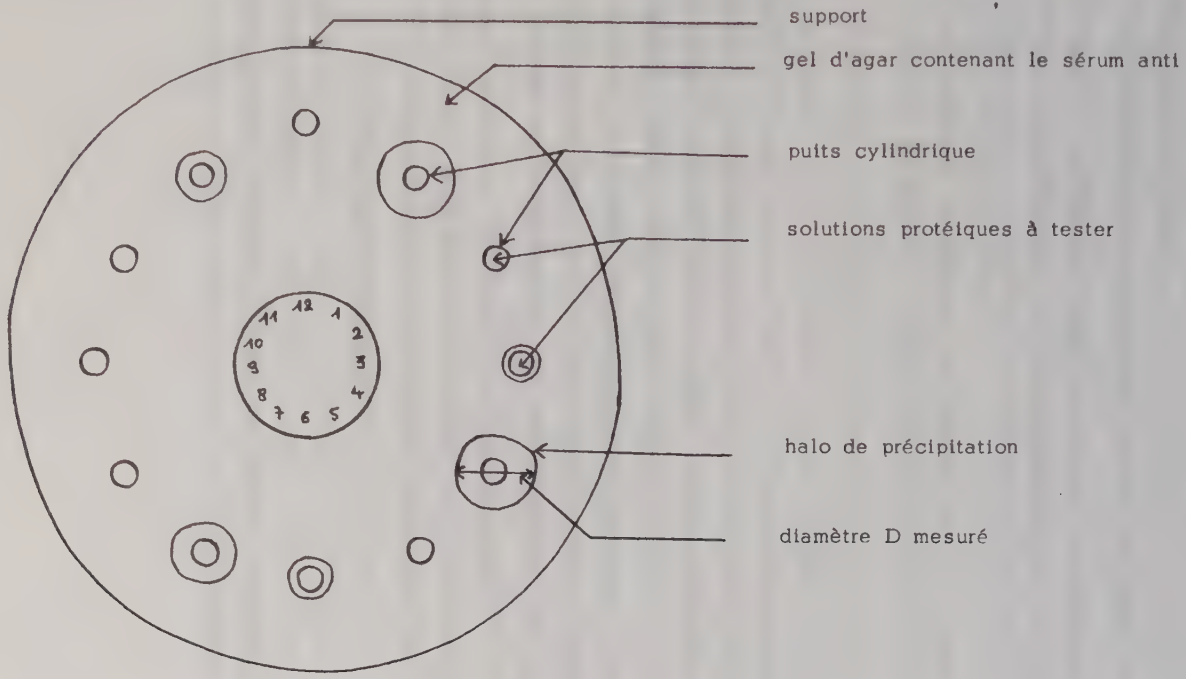
Après diffusion complète en douze heures à 20°C, le halo de précipitation observé dans le cas d'une réaction positive, détermine une surface qui varie directement avec la quantité d'antigène et inversement avec la concentration d'anticorps dans le gel. Il est ainsi possible de tracer une courbe en prenant comme ordonnée le carré du diamètre de l'anneau précipité, soit D^2, et comme abscisse la concentration de la protéine cherchée dans la denrée suspecte, soit C ; la courbe obtenue est une droite d'équation générale

$$D^2 = k_1 \times C + k_2$$

HAUSER, BICANOVA et KUNZLER ont recherché par cette méthode l'addition de protéines étrangères (protéines d'oeuf, de soja, caséinate de sodium) dans les produits carnés.

Dans cette méthode, pour une détermination quantitative, il est important, comme le souligne BAUDNER, de disposer de sérum anti monospécifique.

L'immunodiffusion radiale ne convient pas pour l'analyse d'un système complexe de protéines.



Immunodiffusion radiale

2) L'électro-immunodiffusion

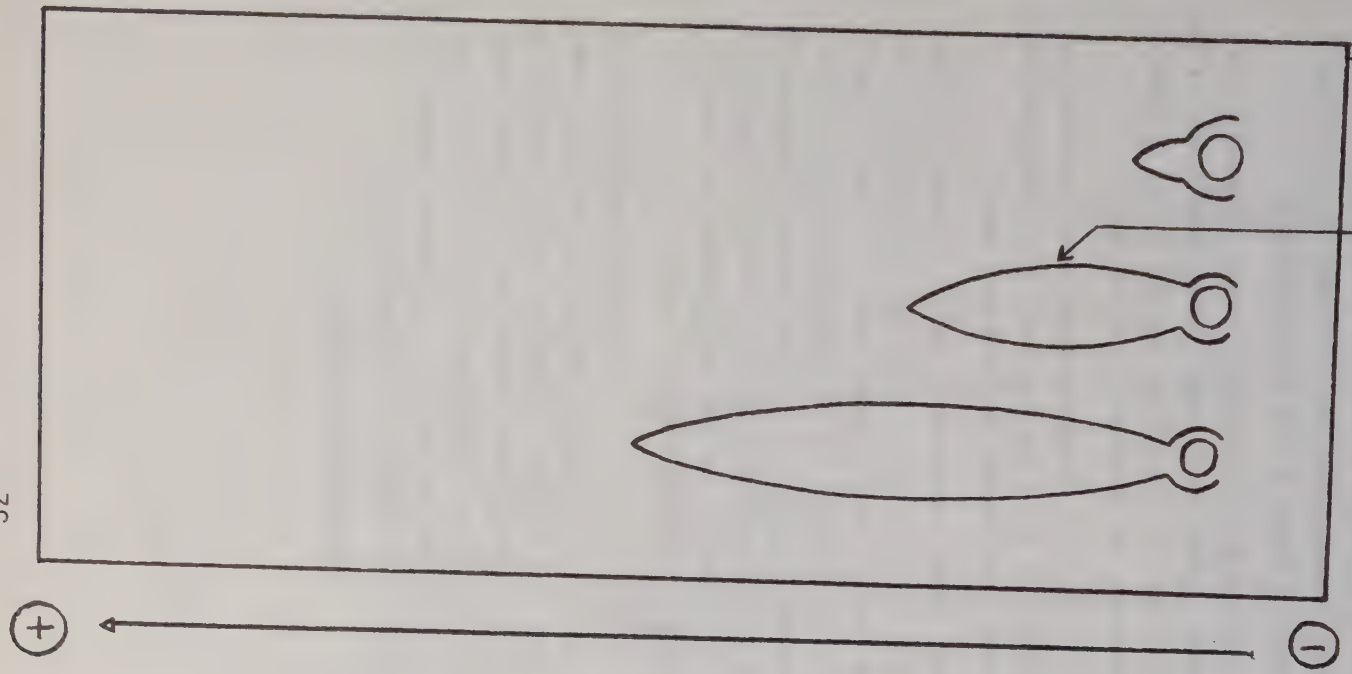
Dans la méthode précédente, les distances à mesurer sont relativement courtes et le point final de la réaction, du fait de la diffusion radiale, n'est pas précisément défini; il s'ensuit une erreur assez grande quant à la relation existant entre la position des lignes de précipité et la concentration des réactifs dans le gel. Par contre, avec l'électro-immunodiffusion, décrite par LAURELL, en 1966, la précision des mesures est incontestablement améliorée.

La solution protéique placée dans une cupule est soumise à l'action d'un courant électrique qui oriente sa diffusion dans le gel selon une direction unique; on parle d'immunodiffusion unidirectionnelle. L'apex du précipité formé au début de la séparation se déplace à partir du point de départ de l'électrophorèse, ce qui détermine un profil de plus en plus fin et pointu jusqu'à ce que, après un temps optimal du processus, tout l'antigène ait été utilisé. L'image du précipité est alors caractéristique : en cône, en fusée (" rocket ") ou en dents selon les auteurs.

A une concentration donnée d'anticorps dans le gel et à un voltage constant, la longueur du cône et la concentration d'antigène dans l'extrait suivent une relation linéaire.

SINELL et MENTZ emploient une lame porte-objet en tant que support du milieu gélifié. Du côté de la lame correspondant à la cathode et à 2 mm du bord, sont situées trois cupules espacées de 7 mm, chacune de 3 mm de diamètre. Toutes reçoivent huit microlitres de la solution d'antigène.

L'électrophorèse dure 4 heures pour une différence de potentiel de 250 volts. La lame est lavée immédiatement après par immersion dans une solution physiologique de chlorure de sodium fréquemment renouvelée, puis séchée par incubation à 37°C et colorée. La mesure est effectuée à partir du centre d'une cupule jusqu'au point final de la réaction; l'incertitude sur cette mesure est de 0,05 mm.



Electro-immunodiffusion

SINELL et MENTZ ont appliqué cette technique à la recherche de lactoprotéines solubles. Ils ont montré que le type de prétraitement du matériel (fumage, ébullition, autoclavage) n'avait aucun effet sur la longueur des lignes de précipitation.

SINELL cite, en outre, l'obtention de résultats positifs dans la recherche de toxines botuliniques et d'entérotoxines staphylococciques.

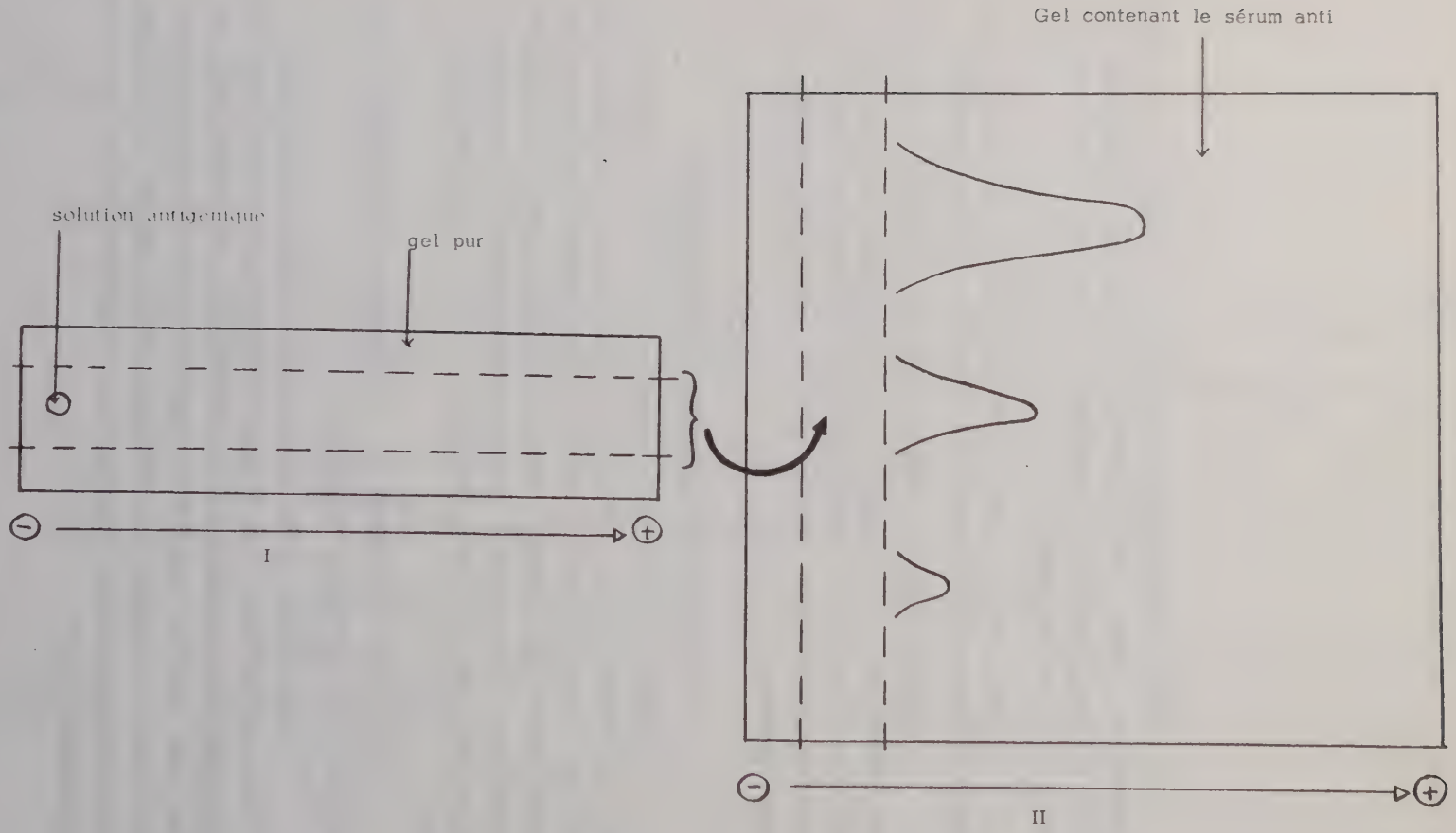
BAUDNER, HYSLOP, de même que BESSEMAN et LAMBION ont fait appel à cette méthode pour la mise en évidence de protéines végétales. Leur détection est d'ailleurs d'autant plus facile qu'étant donné leur poids moléculaire, elles migrent nettement plus rapidement que les protéines d'origine animale.

3) L'électro-immunodiffusion bidimensionnelle

RESSLER a élaboré cette méthode en 1960. Elle comporte deux étapes : la première est une simple électrophorèse de la solution antigénique dans un gel d'agar pur; dans la seconde l'électrophorégramme obtenu est transféré dans un gel contenant le sérum anti puis soumis à une nouvelle électrophorèse, réalisée cette fois perpendiculairement à la précédente. Cette deuxième phase est donc assimilable à l'électro-immunodiffusion de LAURELL.

La surface déterminée par le précipité est directement proportionnelle à la concentration antigénique.

Cette méthode permet une excellente séparation des divers constituants antigéniques d'un mélange, lesquels peuvent alors faire l'objet d'une estimation semi-quantitative simultanée. Elle est intéressante par ailleurs pour apprécier le degré de dénaturation d'une denrée à la suite d'un traitement quelconque; il suffit pour cela de comparer les diagrammes électrophorétiques obtenus, d'une part avec le produit traité, d'autre part avec le matériel natif.



Electro-immunodiffusion
bidimensionnelle

SINELL, KLUGE.WILM, BAUDNER ont apprécié cette méthode mais remarquent justement que sa réalisation reste délicate.

B) LES TECHNIQUES DE DIFFUSION DOUBLE

1) La double immunodiffusion

La double diffusion, telle qu'elle fut réalisée par OUCHTERLONY en 1948, s'effectue généralement dans des boîtes de Pétri. Plusieurs cupules disposées en rosettes sont creusées dans la couche d'agar: l'une au centre, quatre ou six autres en périphérie.

a) aspect qualitatif

Cette première modalité de mise en oeuvre de la méthode consiste à disposer dans la cupule centrale l'immunsérum, et dans les cupules périphériques différentes solutions antigéniques. Un antigène est alors identifié lorsque l'on observe entre la cupule considérée et la cupule centrale contenant les anticorps homologues une ligne ou un croissant de précipitation dont la concavité est tournée vers la cupule centrale.

De nombreux auteurs ont souvent recouru à cette méthode, en préliminaire à la conduite de l'identification sérologique proprement dite d'un produit, afin de vérifier la monospécificité d'un sérum anti et de rechercher des parentés antigéniques éventuelles entre plusieurs substances par l'étude des réactions croisées.

La spécificité d'un sérum anti est testée en le faisant réagir avec différents antigènes hétérologues. Ainsi, un sérum anti obtenu par immunisation d'un lapin avec des protéines sériques bovines montre une réaction avec des protéines sériques ovines. Pour remédier à ce défaut de spécificité, il suffit d'absorber l'immunsérum avec une solution de protéines sériques ovines.

Quant à la parenté antigénique de deux substances, elle peut être précisée lorsqu'elles sont disposées dans des cupules périphériques voisines. Il y a identité antigénique lorsque les deux bandes de précipitation confluent pleinement. Si, par contre, elles se croisent nettement ou s'il n'existe une réaction que pour une seule des cupules, les deux substances sont différentes. Dans le cas où la confluence entre les deux bandes n'est pas parfaite et que l'une d'elles se prolonge par un éperon, cela signifie que la communauté antigénique entre les deux substances n'est que partielle, c'est-à-dire qu'elles possèdent en commun seulement certains déterminants antigéniques.

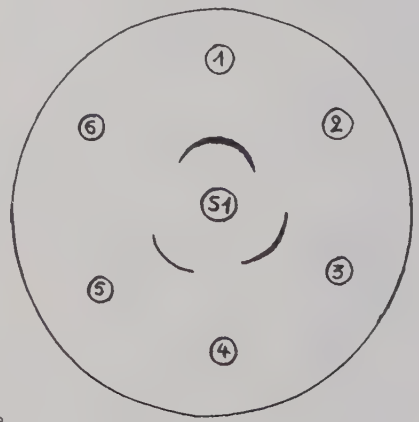
Rapppelons que, dans le cas d'une expérience dont le but est de réaliser la détermination quantitative d'un antigène donné, il est absolument indispensable de travailler avec un sérum anti monospécifique, d'où il ressort l'intérêt que présente la connaissance des parentés antigéniques de certaines substances. Il en est ainsi notamment des albumines provenant d'animaux d'espèces différentes mais de même famille, ou bien de certaines protéines d'origine végétale. Parmi les études les plus récentes, MANZ a bien établi que les albumines sériques et les composants de type albumine d'extraits musculaires d'espèces animales voisines, comme les bovins et les ovins en particulier, possédaient des antigènes spécifiques de l'espèce d'origine d'une part ainsi que des antigènes communs à ces espèces d'autre part. LLEWELLYN par ailleurs a fait la preuve de la possibilité de réactions croisées entre un sérum anti-protéines de soja et de nombreuses autres protéines végétales ou différentes épices ; en revanche, ce sérum ne réagit pas du tout en présence de protéines animales.

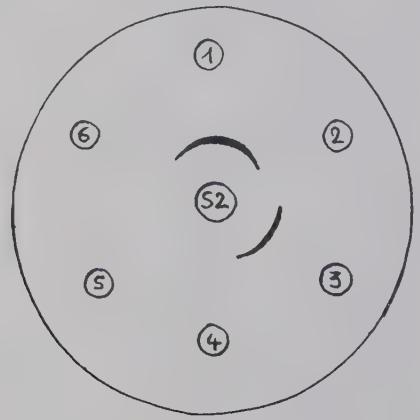
b) aspect quantitatif

La double diffusion d'Ouchterlony a été très peu utilisée pour les analyses quantitatives. KOTTER et HERRMANN procèdent en déposant la solution d'antigène à analyser dans la cupule centrale, tandis que les cupules périphériques reçoivent le sérum anti selon une dilution géométrique.

cupules :

1 sérum bovin
2 extrait musculaire de porc
3 extrait musculaire de boeuf
4 extrait musculaire de cheval
5 extrait musculaire d'ovin'
6 soluté physiologique de chlorure de sodium





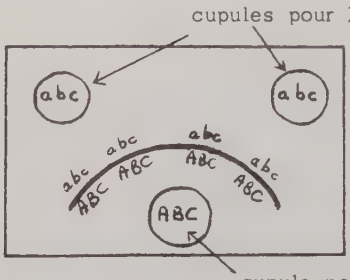
S 1 sérum anti protéines sériques de bovin
S 2 sérum anti protéines sériques de bovin après absorption avec des protéines sériques d'ovin

lignes de précipitation

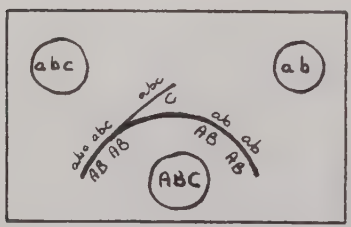
Etude des réactions croisées

a, b, c, = déterminants antigéniques

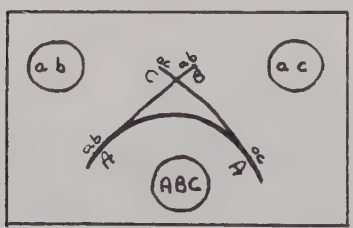
A, B, C, = sites anticorps correspondants



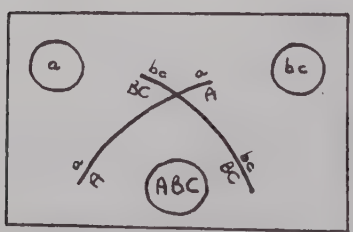
1 - confluence complète de bandes voisines



2 - éperon



3 - éperons



4 - croisement

Cependant WARNECKE, WYLER, afin d'éviter de se trouver en excès d'antigène, préfèrent placer l'immunsérum au centre et utiliser des dilutions de la solution antigénique. Cela correspond au procédé α de la méthode de superposition en milieu liquide et l'interprétation de la réaction en est analogue : la dilution pour laquelle apparaît un précipité permet de calculer le taux d'antigène de la denrée.

KRAACK, quant à lui, a mis au point une micro-méthode avec laquelle il obtient des résultats identiques mais qui a l'avantage de ne réclamer que de petites quantités de réactifs, en l'occurence 20 microlitres de sérum ou 10 microlitres de la solution d'antigène par cupule, soit environ dix fois moins que dans les autres méthodes. C'est une technique de routine qu'il complète, pour les réactions douteuses, par une méthode plus sensible, l'hémagglutination indirecte.

2) L'immuno-électrophorèse

Elle résulte de l'association de l'électrophorèse et de la double immunodiffusion qui sont mises en oeuvre successivement. Ce sont GRABAR et WILLIAMS qui, en 1953, ont été à l'origine de cette méthode d'analyse. En 1955, SCHEIDEGGER a proposé une micro-méthode directement dérivée de celle-ci et ne nécessitant que cinq microlitres de sérum anti. Le gel est supporté par une lame porte-objet. Il comporte un réservoir central et une gouttière, laquelle, afin de garantir l'homogénéité du champ électrique qui sera appliqué au milieu, est seulement incisée et non évidée. La solution à analyser est déposée dans le réservoir puis subit une électrophorèse dont la durée et la différence de potentiel appliquée doivent être bien déterminées ; selon les chercheurs, elles varient respectivement de 40 à 60 minutes et de 180 à 250 volts. Après quoi, on évide la gouttière et on la remplit de sérum anti. Les différents antigènes séparés en fonction de leur mobilité électrophorétique diffusent radialement tandis que les anticorps diffusent perpendiculairement; à un certain rapport

de concentration, apparaissent des arcs de précipitation dont la concavité est tournée vers le point de départ des antigènes.

L'intérêt de cette méthode est donc de permettre la détection de plusieurs composants dans un mélange, notamment les protéines végétales par rapport aux protéines animales. Une lecture quantitative directe est bien évidemment difficile. En revanche, une approche quantitative se conçoit par la comparaison de tests effectués d'une part avec la denrée à analyser, d'autre part avec un matériel de mêmes composition et fabrication.

Le meilleur moyen dans ce cas consiste à réaliser la réaction sur une seule lame porte-objet : il suffit de disposer la solution à analyser et la solution de référence d'un côté et de l'autre d'une gouttière longitudinale médiane.

Un autre aspect de cette façon de procéder apparaît lorsqu'on emploie, d'une part un produit non traité, et d'autre part ce même produit après traitement; il devient alors aisé de déterminer si des modifications de la constitution du produit ont été provoquées par ce traitement.

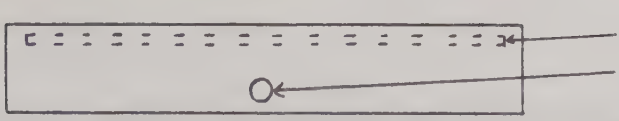
L'immunoélectrophorèse a été bien appréciée par de nombreux auteurs dont SINELL, HANSON, ENOCH, GUNTHER, KRUGER ainsi que ARTAZ et BIANCHI qui ont pratiqué leurs expériences avec l'acétate de cellulose en tant que support de réaction.

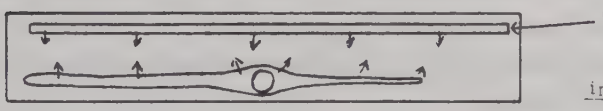
3) L'immunodiffusion verticale

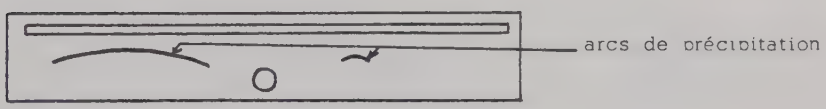
PETER a utilisé, en 1970, cette méthode particulière qui est bien une diffusion double mais différée.

Le milieu gélosé recouvrant une lame de verre comporte un ou plusieurs trous uniquement destinés à recevoir l'antigène. Dans un premier temps, cet antigène est laissé à diffuser soit de manière passive, soit par électrophorèse pendant une heure. Dans un deuxième temps, l'agar est recouvert avec quelques gouttes de sérum anti que l'on étale uniformément

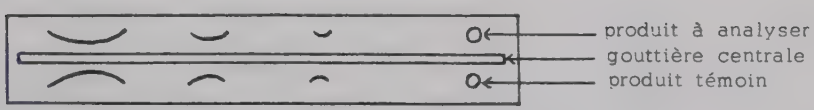
Immuno-électrophorèse







Immuno-électrophorèse comparée

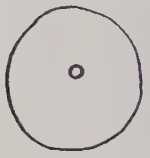


à l'aide d'une tige de verre; ce sérum diffuse verticalement. La réaction est interprétée dès 5 à 8 heures après.

Dans le cas de diffusion passive, la concentration de l'antigène dans la denrée est d'autant plus élevée que le halo de précipité est plus grand.

Lors d'électrophorèse, une faible teneur en protéines se traduit par un parcours plus long. Plus grande est la mesure transverse de la zone de précipitation et plus elle enveloppe la cupule de l'antigène, plus la quantité de ce dernier est importante. Cette méthode peut être employée d'un point de vue semi-quantitatif par comparaison avec des échantillons de composition précise connue.

Immunodiffusion verticale

- après diffusion passive de l'antigène	- après électrophorèse de l'antigène	Concentration correspondante de l'antigène dans le produit testé
		0,5 %
		1 %
		2 %

LES MÉTHODES BASÉES SUR UNE RÉACTION D'AGGLUTINATION

Ces méthodes sont fondées sur la fixation de l'antigène sur des éléments figurés, sans que soit pour autant gênée leur capacité de réaction avec les anticorps homologues. Ainsi, la mise en présence du sérum anti spécifique se traduira par l'agglutination de ces particules, c'est-à-dire leur réunion en amas directement visibles à l'oeil nu. On distingue deux techniques selon le support de l'antigène, qui peut être représenté soit par des globules rouges, soit par des particules de matière synthétique.

I) L'HEMAGGLUTINATION INDIRECTE

1) Principe et mécanisme

Ainsi qualifiée, par opposition à l'hémagglutination directe qui résulte de l'intervention d'anticorps agglutinants dirigés contre les globules rouges eux-mêmes, l'hémagglutination indirecte a été décrite dans son principe par BOYDEN en 1951.

C'est une hémagglutination dite passive ou encore conditionnée. Les globules rouges ne sont en fait que des supports permettant en quelque sorte de visualiser la réaction entre les antigènes fixés à leur surface et les anticorps dirigés contre ces derniers. L'artifice auquel il est fait appel pour obtenir des globules rouges conditionnés, autrement dit couplés aux antigènes considérés, est de nature chimique ou immunologique.

Les liaisons chimiques sont covalentes lorsqu'elles sont produites par des agents de couplage tels que la benzidine bisdiazotée, le glutaraldéhyde, le carbodiimide, ou non covalentes avec l'acide tannique, le

chlorure de chrome... Quant aux ponts de nature immunologique, ils sont obtenus par l'intermédiaire d'anticorps anti-érythrocytaires non agglutinants, par exemple les anticorps anti-facteurs Rhésus ou de fragments F_{ab} d'anticorps agglutinants. Ce procédé immunologique offre l'avantage d'éviter l'auto-agglutination des globules rouges par l'agent de couplage chimique.

Le phénomène de l'agglutination procède de la création de ponts intercellulaires et de l'abaissement des forces électrostatiques de répulsion entre les globules rouges chargés électronégativement.

2) Préparation des globules rouges

Nous décrivons essentiellement la technique de Boyden, retenue par de nombreux chercheurs car de mise en oeuvre relativement aisée, et dont HERRMANN et MERKLE ont proposé une standardisation.

L'agent de couplage est le tannin qui permet selon KRUGER et GROSSKLAUS , citant Stavitsky, des réactions plus sensibles qu'avec la bisdiazobenzidine par exemple.

Les globules rouges proviennent le plus souvent d'un mouton mais peuvent être éventuellement obtenus d'un autre animal : lapin, cobaye, souris, poule... Il est recommandé d'utiliser un seul donneur pour une même série de tests, afin d'éviter des différences dans les réactions.

Le sang frais est recueilli dans une fiole contenant quelques billes de verre, et il est agité avec précaution pendant une quinzaine de minutes jusqu'à refroidissement. Le sang est alors soumis à une centrifugation de 2 000 tours par minute; le culot de globules rouges est lavé au moins trois fois avec un soluté physiologique de chlorure de sodium, afin d'éliminer les globules rouges hémolysés, susceptibles de gêner ultérieurement la fixation de l'antigène.

Le pré-traitement des globules rouges par le tannin constitue l'étape suivante de leur préparation. On procède tout d'abord au mélange d'une suspension de globules rouges à 8 pour cent avec un volume égal d'une

solution de formol à 3,3 pour cent; le formol à concentration plus élevée provoquerait une hémolyse plus marquée. Ce mélange est placé à l'étuve, à 37°C pendant 20 heures. Après centrifugation, le sédiment est lavé au moins trois fois jusqu'à ce que le surnageant reste clair. Le culot est alors repris avec une solution physiologique de chlorure de sodium à un pH de 7,2, afin d'avoir une suspension de globules rouges à 3,3 pour cent. Dans cette suspension soumise à une agitation légère, on ajoutte goutte à goutte un volume égal d'une solution de tannin à 1/40 000 . Le mélange est ensuite placé à l'étuve, à 37°C pendant 30 minutes, après quoi il est centrifugé puis le culot lavé plusieurs fois.

La mesure des concentrations en globules rouges est assurée grâce à un électrophotomètre, ce qui évite les erreurs de mesure par pipettes.

La sensibilisation des globules rouges est quant à elle une étape essentielle, car elle peut être à l'origine de réactions défectueuses.

Les globules rouges sont remis en suspension dans du soluté physiologique de pH 6,4, à une concentration de 3,3 pour cent, à laquelle on ajoute un volume égal de la solution d'antigène. Cette solution a été au préalable traitée avec des globules rouges non tannés, à raison de dix pour cent de son volume dans le but d'empêcher une saturation complète des globules rouges; on utilise le surnageant récupéré après centrifugation de quinze minutes. Le mélange soumis à une agitation légère et permanente est mis à l'étuve, à 37°C pendant une heure. La centrifugation suivie de lavages répétés permet d'obtenir les érythrocytes ayant fixé l'antigène.

La concentration antigénique dans le mélange sensibilisant est d'une grande importance pour obtenir une réaction optimale. Il est ainsi préconisé d'utiliser une solution protéique à 0,5 pour cent dans le cas des lactoprotéines solubles, de la poudre de plasma sanguin, des protéines de soja, des protéines de petit lait (ce qui donne de 24 à 32 mg de substance soluble par millilitre de globules rouges), une solution à 0,1

pour cent pour l'ovalbumine ou à 25 pour cent pour le blanc d'oeuf de poule (soit respectivement 36 ou 30 mg de substance soluble par ml de globules rouges

L'utilisation d'une trop grande concentration soit en agent de couplage, soit en protéine sensibilisante, provoque l'agglutination spontanée des globules rouges.

Il apparaît fondamental d'assurer la conservation des globules rouges afin d'éviter leur hémolyse et l'atténuation, voire la perte de leur caractère sensibilisé. Les recherches d'HERRMANN et MERKLE ont abouti à la proposition d'une méthode optimale de conservation :

Les globules rouges, aussitôt après avoir été recueillis chez l'animal donneur, peuvent être maintenus sans problèmes au réfrigérateur à 4°C pendant 14 jours. Juste avant son traitement par l'acide tannique, une suspension de globules rouges à 8 pour cent est mélangée à un volume égal de formol à 3 pour cent. L'ensemble est placé dans une étuve à 37°C pendant vingt heures, puis on procède à leur lavage à l'aide de soluté physiologique salé. Après leur sensibilisation, les globules rouges sont placés dans un diluant composé soit de sérum de lapin à 4 pour cent et de saccharose à 10 pour cent, soit de sérum de lapin à 1 pour cent et de merthiolate à 1 pour dix mille, pour donner une suspension à 10 pour cent. A la suite de cela, la réfrigération de ce mélange ne conserve les globules rouges sensibilisés que pendant quatre semaines; au-delà se manifeste une diminution très nette de sensibilité et des réactions spontanées d'agglutination assez forte interviennent fréquemment. En revanche, avec mise à l'abri de la lumière, la lyophilisation ou la congélation à -20°C conservent intactes toutes les propriétés des globules rouges sensibilisés au moins pendant sept mois.

3) Préparation du sérum anti

Dans le cas de la méthode d'hémagglutination indirecte, la préparation de l'immun sérum telle que nous l'avons vue précédemment doit être complétée. Une mise à l'étuve, à la température de 56°C pendant trente minutes, supprime les propriétés hémolysantes du sérum. En outre, afin d'éliminer les hémagglutinines hétérologues, ou iso-agglutinines, il faut effectuer trois fois au minimum la centrifugation d'un mélange de sérum anti avec 10 pour cent de son volume en globules rouges de moutons lavés non traités par le tannin. KARPAS pour sa part fait disparaître ces agglutinines non spécifiques par le mélange du sérum avec un volume égal de formol, à la suite de quoi il récupère la phase aqueuse qu'il traite de manière identique deux à trois fois.

4) Conduite de l'hémagglutination indirecte

a) macrométhode

D'un point de vue pratique, il est préférable pour une même série de tests d'utiliser un support unique. Celui-ci est constitué d'une galerie comportant quatre rangées d'une trentaine de tubes à hémagglutination au maximum. A sa base, sous les tubes, est disposé un miroir incliné à 45 degrés.

Chaque tube de la galerie reçoit tout d'abord 0,5 ml de soluté physiologique de chlorure de sodium. Dans la première rangée, on ajoute 0,5ml de sérum anti dans le premier tube seulement. Les tubes suivants de cette rangée reçoivent chacun successivement la moitié du mélange contenu dans le tube qui le précède directement , puis, en fin de rangée, la moitié du contenu du dernier tube est éliminée : cela réalise une progression géométrique dans la dilution du sérum anti. Il est ensuite procédé à une répartition semblable dans les tubes de la deuxième rangée mais avec cette différence que le sérum anti a été préalablement traité avec l'extrait à analyser, de la façon suivante : un mélange à raison de 1 ml de sérum anti

pour 0,5 ml d'extrait douteux est mis à incuber une heure à 37°C puis centrifugé pour utiliser le surnageant clair. La même manipulation est réalisée pour la troisième et la quatrième rangée mais avec un immunsérum préalablement traité respectivement avec un matériel contenant l'antigène homologue et un autre ne contenant pas cet antigène. Enfin 0,1 ml de la solution de globules rouges tannés sensibilisés est versé dans chaque tube de chacune des rangées.

Les tubes sont alors agités légèrement dans l'étuve à 37°C pendant une heure, puis sont laissés une nuit à la température de la pièce.

Bien évidemment, le recours à des pipettes différentes pour chaque sérum et pour les globules rouges sensibilisés s'impose.

b) microméthode

C'est une technique de choix retenue par nombre de chercheurs parmi lesquels KARPAS, HERRMANN et MERKLE, SINELL, KRAACK, WAGENSTALLER. Elle présente, en effet, des avantages notables : quantités relativement faibles des réactifs utilisés et surtout dépense très réduite en travail, du fait d'une part de la possibilité de réaliser plusieurs séries d'expériences sur une même galerie, et d'autre part du développement plus rapide des réactions (quelques dizaines de minutes au lieu de plusieurs heures). Le support approprié pour cette méthode dite " microtitre " est un plateau de plexiglass comportant des petites cupules en U. La manipulation est identique à celle de la macrométhode, mais les doses correspondantes de réactifs qui sont employées diffèrent : 0,025 ml pour le soluté physiologique de chlorure de sodium ; 0,025 ml pour les immunsérums dilués au 1/4 ; 0,025 ml pour la suspension à 1,25 pour cent de globules rouges tannés sensibilisés.

5) Lecture et interprétation de la réaction

L'appréciation de la réaction s'effectue par l'observation du sédiment de globules rouges au fond des tubes de la deuxième rangée en comparaison avec ceux des autres rangées.

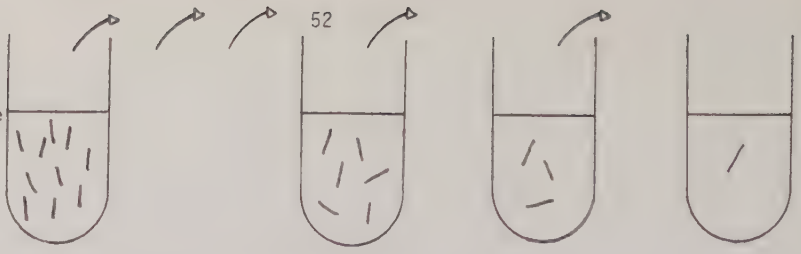
Il y a hémagglutination lorsque les globules rouges se rassemblent pour former un tapis uniforme sur tout le fond du tube; un bord de tapis lisse ou légèrement déchiré traduit une hémagglutination plus forte que lorsqu'un anneau étroit est présent autour du tapis. Elle correspond à la visualisation macroscopique de la réaction immunologique survenue entre les antigènes portés par les globules rouges et les anticorps du sérum anti. Or, ce sérum a fait l'objet d'un traitement préalable avec l'extrait à analyser; on peut alors conclure à l'absence de la protéine recherchée dans la denrée analysée.

Par contre, la présence d'antigènes homologues dans l'extrait entraîne l'occupation des sites anticorps rendant le sérum anti inactif d'un point de vue immunologique. L'adjonction des globules rouges sensibilisés ne peut donc provoquer de réaction sérologique; il y a alors inhibition de l'hémagglutination et les globules rouges se déposent par gravité au point le plus profond du tube en donnant un anneau prononcé ou une formation caractéristique en bouton.

En comparant l'hémagglutination observée dans les tubes de cette deuxième rangée avec celle de la première, on constate une diminution du titre d'agglutination en rapport avec la présence de la protéine recherchée dans l'extrait; autrement dit, plus la quantité de cette protéine dans la denrée est élevée, plus la réaction d'hémagglutination est négative dès les premières dilutions. La troisième et la quatrième rangée servent respectivement de témoins pour des hémagglutinations négatives et positives, c'est-à-dire de contrôles positifs et négatifs en ce qui concerne la présence de protéine dans la denrée. Notons que dans la microméthode, les

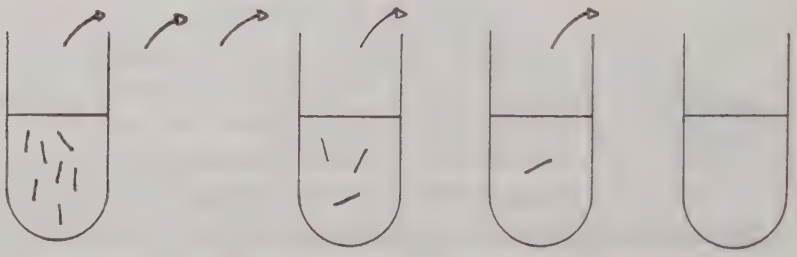
1ère rangée

dilution croissante du sérum anti

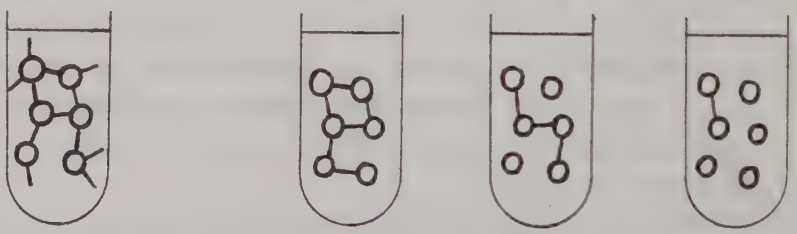


2ème rangée

dilution croissante du sérum anti après réaction avec l'extrait à analyser

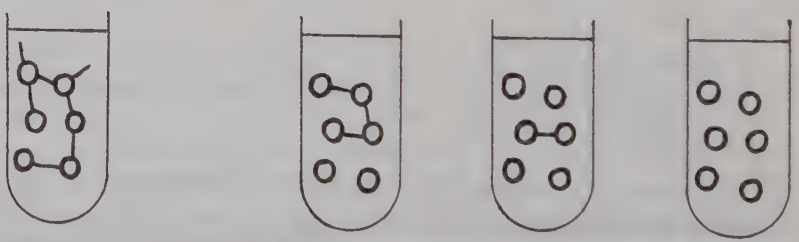


1ère rangée



adjonction de la même quantité d'hématies sensibilisées dans chaque tube

2ème rangée

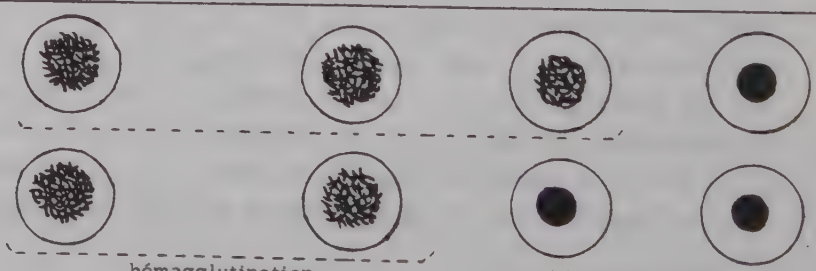


INCUBATION

1ère rangée

LECTURE

2ème rangée



hémagglutination

pas d'hémagglutination

résultats sont lisibles après une quarantaine de minutes alors qu'il faut attendre plusieurs heures dans la macrométhode.

II) L'AGGLUTINATION DE PARTICULES DE LATEX

Le latex se présente en solution aqueuse sous la forme de vinylmonomères. La formation de petits polymères sphériques donne une suspension colloïdale que l'on stabilise par l'adjonction d'émulsionnants chimiques. Les antigènes peuvent être fixés par une simple adsorption à la surface de ces particules de diamètre déterminé, variant de 0,1 à 1,2 microns.

La conduite de la réaction et son interprétation sont en tout point analogues à celles de la méthode précédente.

FROMM a fait appel à l'agglutination de particules de latex pour la recherche de lactoprotéines dans des produits chauffés à haute température. L'unique intérêt de cette méthode réside dans la longue conservation des particules, grâce au simple recours à la réfrigération.

A côté de cela, la sensibilisation de ces particules peut constituer une source importante d'erreurs. En effet, à de hautes concentrations, les molécules d'antigène ne sont pas adsorbées en totalité; il s'ensuit que les anticorps réagissent avec des antigènes libres. L'absence d'agglutination entraîne alors une conclusion erronée. L'emploi de faibles concentrations d'antigène, qui ne permettent pas son adsorption sur les particules, a les mêmes conséquences. En outre, étant donné la tendance marquée des particules de latex à s'agglutiner spontanément, les facteurs physiques du milieu de réaction, par exemple la tension superficielle, qui influent sur la stabilité de la suspension, ne sont pas à négliger.

Signalons que des particules de matière synthétique différente (encre de chine..) ont pu être utilisées, pour lesquelles ces remarques demeurent pareillement valables.

MÉTHODES BASÉES SUR LE MARQUAGE D'UN RÉACTIF IMMUNOLOGIQUE

I) L'IMMUNOFLUORESCENCE

Cette méthode, mise au point en 1950 par COONS et KAPLAN, est fondée sur le principe suivant : l'addition d'un colorant fluorescent, le plus souvent l'isothiocyanate de fluorescéine, à une solution d'anticorps purifiée aboutit à la fixation d'anticorps sans que soit diminuée leur capacité de réaction immunologique spécifique.

La solution d'anticorps obtenue est déposée sur des coupes congelées de tissu ou de denrée ayant subi une fixation. Les anticorps marqués se fixent sur les antigènes correspondants qui, ce qui n'est pas le cas dans les autres méthodes sérologiques que nous avons envisagées, ne se trouvent pas en solution. Un lavage élimine les anticorps non fixés puis les complexes antigène-anticorps sont révélés en microscopie optique par leur fluorescence.

HERRMANN, HOLPERT et PFEIFFER ont procédé selon la technique suivante : l'échantillon à analyser est fixé par action du formol pendant douze heures, après quoi il subit un lavage de trente minutes. Des coupes d'une épaisseur de dix microns sont pratiquées, recueillies dans une solution salée tamponnée, puis montées sur des lames porte-objet. Elles sont ensuite laissées à sécher une nuit entière. La fluorescence propre des préparations est éliminée en les plongeant dans l'acétone pendant vingt minutes. On met alors en oeuvre la réaction sérologique par dépôt de la solution d'anticorps marqués par l'isothiocyanate et mise à l'étuve des lames à 37°C. Au bout de trente minutes, l'élimination des substances fluorescentes non fixées est assurée par lavage répété avec une solution salée tamponnée jusqu'à ce que le liquide recueilli ne montre plus aucune fluorescence. L'observation de la coupe se fait ensuite au microscope à un grossissement de 320. Dans le

cas d'une réaction positive, des grains fluorescents vert pomme sont mis en évidence.

L'intensité de la fluorescence varie assurément avec la concentration de la protéine dans la denrée, mais il est difficile de l'exprimer avec précision quantitativement.

A côté de cette technique d'immunofluorescence directe, HOLPERT propose deux procédés indirect et complémentaire , dont la sensibilité est plus grande, mais qui aussi, comme la méthode de déviation du complément, nécessitent la réalisation de nombreux tests témoins, ce qui en limite l'utilisation pratique.

II) LES METHODES RADIO-IMMUNOLOGIQUES

Le titrage radio-immunologique, connu sous l'abréviation R.I.A. (Radio-Immuno-Assay) a été proposé pour la première fois en 1960 par YALOW et BERSON. L'emploi de cette technique en analyse alimentaire pour la recherche de substances étrangères est évoqué par HEBEL.

Le principe du titrage repose sur la compétition qui existe à l'échelle moléculaire, pour la fixation à l'anticorps, entre la substance antigénique à doser et cette même substance marquée par un élément radio-actif: ^{125}I, ^{131}I, ^{3}H, ^{51}Cr, ^{75}Se, ^{14}C, ^{32}P, ^{35}S, ^{57}Co, ^{58}Co... Les préoccupations suivantes orientent le choix de l'isotope destiné au marquage : la totalité des isotopes radio-actifs doit être sur la molécule choisie; l'activité spécifique de la molécule marquée doit être maximale ; le phénomène de radiolyse doit être limité.

Dans les conditions optimales de la réaction immunologique, il s'établit un équilibre dynamique entre les antigènes libres et les antigènes liés aux anticorps. L'adjonction de nouveaux antigènes pouvant être fixés par les anticorps fait apparaître un nouvel équilibre, par suite du déplacement d'une partie des antigènes fixés à l'origine par les anticorps.

Ce déplacement est proportionnel en importance aux antigènes ajoutés au système.

De l'enregistrement du processus de déplacement, par mesure de la radio-activité des antigènes marqués fixés aux anticorps, il est possible de déduire la quantité d'antigène ajouté.

Ainsi il convient d'abord de déterminer une courbe standard; elle montre la décroissance du pourcentage d'antigène marqué qui se fixe à l'anticorps en présence de quantités croissantes d'antigène à doser ajouté au milieu. On évalue ensuite, pour l'échantillon à analyser, le pourcentage d'antigène marqué lié à l'anticorps dans des conditions identiques. Cette valeur portée sur la courbe de référence permet d'obtenir alors la quantité de substance étrangère présente dans le produit étudié.

Le titrage radio-immunologique comporte les trois étapes suivantes :

&) compétition pour la fixation à l'anticorps

Les réactifs sont mis en présence dans chaque tube pour une incubation de quelques heures à 4°C. On utilise un sérum anti dont la concentration est telle que la moitié de la substance marquée immunologiquement réactive soit liée à l'anticorps. Une concurrence pour la réaction immunologique apparaît entre d'une part la substance radio-active, dont la concentration est constante dans tous les tubes, d'autre part la substance non marquée, qui se trouve soit à une concentration connue pour la détermination de la courbe standard, soit à une concentration inconnue dans le cas de l'analyse d'un produit suspect.

&) séparation des fractions libres et des fractions liées

Les complexes antigène-anticorps restent solubles dans le milieu de réaction. Leur séparation des antigènes libres est fondée sur leur différence de poids moléculaire. Des procédés physiques variés permettent d'assurer cette séparation. Retenons l'adsorption par une solution

de charbon-dextran qui fait intervenir la propriété des molécules de faible poids moléculaire de se fixer à la surface des molécules de charbon. Une solution de charbon-dextran est donc répartie dans les tubes qui, après agitation, sont laissés au repos pendant 15 minutes à 4°C. Par centrifugation, on peut ensuite récupérer la fraction des antigènes libres avec le charbon dans le culot et la fraction des complexes antigène-anticorps dans le surnageant.

&) comptage de la radio-activité

Le surnageant de chaque tube est renversé dans des fioles à comptage pour être soumis pendant cinq minutes à une mesure de radio-activité. La valeur lue sur l'appareil est exprimée en coups par minute.

Une représentation graphique, donnée par la relation $y = f(x)$, est obtenue à l'aide d'un axe des ordonnées portant les différentes valeurs de :

$$y = \frac{B}{B_0}$$

et d'un axe des abscisses pour les valeurs de $x = \text{Log } D$.

B exprime, en coups par minute, la quantité d'antigène marqué lié aux anticorps;

B_0, la quantité d'antigène marqué fixé par les anticorps en l'absence d'antigène non marqué;

D est la quantité d'antigène non marqué présent dans le produit standard ou bien dans l'échantillon à analyser.

Les techniques radio-immunologiques , qui se révèlent d'une extrême sensibilité, présentent toutefois certains inconvénients liés à l'utilisation de composés radioactifs. Ainsi les dangers de la manipulation de radio-éléments et la rigueur de la législation du travail correspondante,

l'acquisition d'un matériel coûteux, la labilité du marqueur réduisent les possibilités de mise en application de ces méthodes.

III) LES METHODES IMMUNO.ENZYMATIQUES

Les méthodes immuno-enzymatiques ont été élaborées par analogie aux méthodes radio-immunologiques. Elles sont issues principalement des travaux effectués dès 1971 par deux équipes : ENGVALL et PERLMANN d'une part, VAN WEEMEN et SCHUURS d'autre part.

Elles sont fondées sur l'utilisation d'un marqueur enzymatique fixé à un anticorps ou à un antigène et peuvent être mises en oeuvre selon deux modalités : en phase homogène ou en phase hétérogène.

Le titrage en phase homogène, peu employé, est essentiellement représenté par la méthode EMIT (Enzyme Multiplied Immuno-Assay Technique) qui intéresse uniquement la recherche d'haptènes : des haptènes marqués entrent en compétition avec les haptènes à doser ; la fixation des anticorps sur les haptènes marqués entraîne la disparition de l'activité enzymatique.

Le titrage en phase hétérogène fait intervenir un support solide sur lequel sont adsorbés ou couplés les molécules d'antigène ou d'anticorps. Le complexe ainsi formé, appelé immuno-adsorbant, permet de capter les anticorps ou les antigènes homologues d'une solution connue ou à analyser. L'immunocomplexe obtenu est détecté par l'intermédiaire d'un réactif immunologique marqué par une enzyme. La dégradation d'un substrat spécifique de l'enzyme choisie fait apparaître un produit coloré qui est apprécié à l'oeil nu ou mesuré en photométrie; l'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'enzyme réagissant, donc d'anticorps ou d'antigène présents dans la solution testée.

La plus connue de ces techniques de dosage en phase hétérogène est la méthode ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) mise au point par ENGVALL et PERLMANN en 1971.

PIROIRD et LOMBARD ont réalisé une étude synthétique de ces méthodes de titrage immuno-enzymatique en phase hétérogène.

Leur mise en oeuvre fait intervenir trois temps : préparation de l'immuno adsorbant; réaction antigène-anticorps; révélation de l'immun-complexe.

Pour la préparation de l'immuno-adsorbant, les microplaques comportant plusieurs séries de cupules se révèlent d'une manipulation commode. Cependant la simple adsorption physique du réactif immunologique sur un tel support en matière plastique ne donne pas entière satisfaction. En effet, il existe également une fixation des autres substances qui, bien que limitée, peut engendrer un bruit de fond parasite lors de la lecture. Deux moyens permettent de pallier ce défaut : le premier consiste à traiter préalablement le support par un agent couplant tel que le glutaraldèhyde ; la création de liaisons covalentes entre les plaques et le réactif immunologique permet de définir avec précision l'intensité de la fixation; le deuxième requiert , après contact du support avec le réactif immunologique, l'emploi d'une solution de Tween, préparée à partir d'acides gras, ou d'une solution de protéines à haut poids moléculaire, par exemple d'albumine sérique bovine; un lavage effectué à l'aide d'une de ces solutions conduit à la saturation des sites de fixation non occupés par l'antigène ou l'anticorps.

Après la réaction immunologique spécifique, la mise en évidence du complexe antigène-anticorps se réalise grâce à la présence d'un conjugué. Celui-ci résulte de l'établissement de liaisons covalentes entre d'une part une enzyme, d'autre part soit l'un des réactifs immunologiques, antigène ou anticorps homologues, soit un anticorps anti-immunoglobuline d'espèce.

Dans ce dernier cas, l'immunocomplexe initial se trouve marqué après une deuxième réaction immunologique. Le couplage par le glutaraldéhyde, par la para-benzoquinone ou par la formation de bases de Schiff préserve l'intégrité de l'activité des molécules unies. Les enzymes les plus souvent utilisées sont la phosphatase alcaline et la peroxydase de raifort. Leur réaction avec, comme substrats respectifs, le para-nitro-phényl-phosphate et l'acide 5 amino-salicylique se traduira par l'apparition d'une coloration jaune dans le premier cas, brune dans le second.

Il est indispensable d'accorder un soin tout particulier au choix des divers réactifs et à leur présentation afin qu'il ne soit introduit dans le milieu de réaction aucune substance qui puisse activer ou inhiber l'enzyme utilisée. Ainsi l'azide de sodium ne doit pas être employé comme conservateur lorsque la peroxydase de raifort, dont il est un inhibiteur spécifique, constitue l'élément marqueur pour le dosage immuno-enzymatique.

La Fixation du Complément

Le complément est un système enzymatique présent dans tout sérum. Il est constitué de neuf molécules qui s'activent successivement l'une l'autre. L'activation de la première fraction est déclenchée par la présence d'un immuncomplexe mais il faut signaler que les anticorps capables de fixer le complément sont différents de ceux intervenant dans les réactions de précipitation. Lorsque cet immuncomplexe se compose de globules rouges et d'anticorps anti-globules rouges, le complément provoque l'éclatement de ces globules rouges ; il y a hémolyse, phénomène visible à l'oeil nu.

Connaissant cela, on doit donc disposer au laboratoire d'un système hémolytique bien déterminé, constitué de globules rouges de mouton, de sérum de lapin anti-globules rouges de mouton, de complément apporté par du plasma lyophilisé de cobaye et dont la dose est définie de telle sorte qu'en présence du complexe antigène-anticorps précédent il y ait hémolyse complète.

Si le sérum que l'on a préparé pour rechercher une protéine déterminée dans une denrée est effectivement mis en présence de celle-ci, il se forme un immuncomplexe qui fixe le complément. Lorsque l'on complètera le système hémolytique, il ne pourra pas y avoir d'hémolyse. Par contre, dans le cas de l'absence de la protéine considérée, le complément sera disponible, ce qui se traduira par l'hémolyse des globules rouges.

Utilisée par WERSCHING en 1960, cette méthode dite plus exactement de " déviation du complément " a permis de détecter des protéines à une concentration de 0,5 pour cent, même après autoclavage de la denrée. Cependant, comme le rapportent également SINELL et KOTTER, le nombre élevé de contrôles à pratiquer avant les recherches pour déterminer la concentration du complément donnant une hémolyse visible entraîne des dépenses trop importantes. De plus, l'application pratique de cette méthode est limitée par le fait qu'un grand nombre de substances, parmi lesquelles les condiments, sont susceptibles de réagir avec le complément.

Quatrième Partie

ETUDE CRITIQUE DES METHODES SEROLOGIQUES UTILISEES DANS LE CONTROLE DES DENREES ANIMALES OU D'ORIGINE ANIMALE

I) *CHAMP D'APPLICATION DES METHODES SEROLOGIQUES*

Nous avons retenu dans notre étude les méthodes sérologiques qui, d'un point de vue pratique, ont pour but la détection de substances étrangères dans une denrée animale ou d'origine animale, ou tout simplement, l'identification spécifique de celle-ci.

Le qualificatif "étrangères " doit être compris au sens large; il se rapporte à deux catégories de substances qui ne devraient pas être présentes dans une marchandise saine et loyale ou bien dont la teneur ne devrait pas dépasser un certain taux.

La première catégorie rassemble des constituants de la denrée alimentaire. Il s'agit d'une part des protéines de remplacement, qui sont substituées, le plus souvent pour des raisons économiques, au composant

essentiel de la denrée, d'autre part des protéines d'addition, qui sont des adjuvants technologiques utilisés dans la fabrication du produit afin d'en assurer la cohésion, de fixer l'humidité, d'émulsifier ou stabiliser les matières grasses. Leur nature est très variable et à l'heure actuelle les ingrédients les plus divers sont susceptibles d'être employés dans la fabrication d'une denrée alimentaire. Il en est ainsi :

- des protéines d'une espèce animale autre (viande de cheval en substitution à de la viande de boeuf; viande de boeuf en substitution à celle de porc; chair de baleine, de kangourou, d'antilope ou d'autre espèce animale protégée dans divers pays; lait de vache remplaçant du lait de chèvre ou de brebis),
- des protéines de plasma sanguin, des lactoprotéines, des ovoprotéines,
- des protéines végétales (soja) dont l'incorporation dans les produits transformés à base de viande subit un net accroissement et , en outre, s'effectue de plus en plus à l'aide de végétaux moins conventionnels (tournesol, fèverolle),
- des protéines de levures, de bactéries...

La deuxième catégorie concerne des substances contaminantes qui se trouvent le plus souvent déjà présentes à l'état de traces dans la matière première destinée à la fabrication de la denrée alimentaire et qui ne sont pas dénuées d'une éventuelle toxicité pour le consommateur. C'est le cas de toxines élaborées par des moisissures ou des bactéries, des résidus de médicaments, de pesticides.

Par ailleurs, il convient de noter que, si le traitement subi par les constituants de la denrée au cours de son élaboration a pu, dans certains cas, limiter les possibilités d'analyses sérologiques, aujourd'hui, dans la mesure ou l'échantillon à analyser est préparé de façon adéquate et le sérum anti correctement choisi, il n'y a plus d'obstacle majeur à ce genre d'investigations.

Ainsi, la recherche de protéines étrangères est aussi bien envisageable dans des produits frais ou congelés que dans des produits transformés par séchage, fumage, cuisson, extrusion ou autre traitement, voire dans des produits avariés. Contentons-nous de rappeler que des denrées ayant subi un chauffage à environ 115°C pendant une vingtaine de minutes ont pu être analysées, si ce n'est quantitativement du moins qualitativement, grâce à des méthodes sérologiques. Pour ces raisons, ces techniques peuvent donc, notamment dans le cadre de la répression des fraudes et du contrôle de la qualité, revêtir un intérêt croissant corrélativement au développement dans l'industrie alimentaire, des fabrications de charcuteries, conserves, plats cuisinés et autres produits transformés d'origine animale.

II) CRITERES DE VALIDITE DES METHODES SEROLOGIQUES

1) Spécificité

La nature immunologique des réactions permettant la mise en évidence d'une protéines dans une denrée à l'aide de méthodes sérologiques confère à ces dernières une spécificité extrême.

Signalons ici qu'au début de ce siècle, certains chercheurs eurent recours à la réaction anaphylactique : la présence éventuelle de la substance en cause dans un produit était révélée in vivo par production d'une réaction d'hypersensibilité sur un animal sensibilisé à cette substance. A côté de l'intensité variable de la réponse, n'autorisant aucune évaluation quantitative, de nombreuses réserves furent émises quant à la spécificité de ce test qui fut alors, à juste titre, abandonné.

En ce qui concerne les méthodes sérologiques réalisables in vitro, la spécificité et donc la validité des tests dépend bien évidemment des qualités intrinsèques du sérum anti mais aussi de l'efficacité des méthodes d'extraction et de purification de la substance recherchée. L'un et l'autre de ces facteurs ont été précédemment évoqués notamment dans des paragraphes propres.

2) Sensibilité

La sensibilité d'une méthode sérologique peut se définir, d'un point de vue théorique, par la quantité minimale d'antigène pouvant être mesurée ou bien par la plus petite quantité d'antigène qu'il faut ajouter au milieu réactionnel pour obtenir une variation de réponse décelable.

ETIEVANT indique comme limite de détection les valeurs de 2,5 et de 0, 001 microgrammes d'azote anticorps, respectivement, pour des réactions de précipitation et pour des réactions d'hémagglutination. C'est la quantité de complexe antigène-anticorps visible qui limite la sensibilité des méthodes d'identification par précipitation, tandis que l'artifice technique consistant à sensibiliser des hématies assure, par hémagglutination conditionnée une révélation bien meilleure de la réaction immunologique. Ces deux types de méthodes peuvent être mis en oeuvre de façon courante, en vue de rechercher la présence de protéines de substitution ou d'addition. Ainsi dans les expériences relatées dans la bibliographie,des protéines ont été mises en évidence dans des produits transformés à des teneurs minimales, selon les chercheurs, de 3 à 1 pour cent pour les méthodes par précipitation en milieu liquide, de 1 à 0,1pour cent pour les méthodes par précipitation en milieu gélifié et de 0,1 à 0,01 pour cent pour les méthodes par hémagglutination.

Récemment sont apparues par ailleurs de nouvelles techniques de titrage immunologique qui ajoutent à une relative rapidité d'exécution et à une bonne reproductibilité, une sensibilité inconnue antérieurement.

Ce sont les méthodes radio-immunologiques d'une part et les méthodes immuno-enzymatiques d'autre part. Elles ont un seuil de détection, selon HEBEL, DUPUY, BIERMANN, de l'ordre du picogramme ou du femtogramme. Ainsi, le champ d'investigation offert par les méthodes sérologiques se trouve considérablement élargi, puisque des substances existant à l'état de traces dans un produit sont maintenant décelables; tel est le cas de résidus médicamenteux, d'hormones, d'enzymes ou de toxines.

3) Précision

La précision mesure la dispersion des résultats autour de la moyenne obtenue pour les mesures faites sur un même échantillon ; une méthode est donc d'autant plus précise que la dispersion est faible. Elle ne peut être valablement appréciée que par une étude mathématique rigoureuse des résultats obtenus sur un certain nombre d'épreuves, auxquels on applique les lois de la statistique.

Comme facteurs déterminants pour la valeur et la précision des résultats, interviennent d'une part la rigueur des différentes manipulations et techniques mises en jeu au cours d'une analyse, en particulier lors de la distribution des réactifs et la réalisation des dilutions, d'autre part la qualité, la justesse des appareils de mesure.

POMERANZ et MELOAN, comme KOTTER et HERRMANN donnent aux méthodes sérologiques une précision moyenne de 2 à 5 pour cent.

La précision varie en fait directement avec la quantité d'antigène à détecter. Elle a une valeur plus élevée, c'est-à-dire moins bonne, pour des quantités croissantes d'antigène. Mais si cela peut, dans une certaine mesure, constituer un élément défavorable pour des mesures quantitatives, l'intérêt de la méthode est conservé lors d'études qualitatives.

4) FIABILITE

Les critères de validité des méthodes sérologiques sont très tributaires des conditions pratiques tant matérielles qu'humaines. C'est pourquoi, la fiabilité de ces méthodes est fondamentalement dépendante, d'une part de la standardisation intégrale des diverses manipulations, non seulement lors du déroulement du processus opératoire lui-même mais aussi de la préparation du matériel et des réactifs, d'autre part de l'uniformisation des modalités d'interprétation des réactions.

A ce propos, si l'échantillon à analyser peut être obtenu de façon régulièrement identique grâce à une méthode d'extraction optimale, tel n'est pas le cas, en revanche, du sérum anti fabriqué par un organisme animal vivant. Aussi, pour chaque immunsérum recueilli, il convient de déterminer les proportions adéquates d'emploi qui permettent d'avoir une réaction visible. Il en est de même pour les lots de sérum disponibles dans le commerce; les possibilités de réactions croisées et les dilutions d'utilisation doivent être indiquées par le fabricant ou recherchées préalablement à toute étude.

Le matériel utilisé, en particulier les supports de réaction, doivent être appropriés à la technique retenue et faire l'objet d'un entretien ou d'une préparation minutieux.

Chaque étape de l'expérimentation doit être déterminée avec les précisions suffisantes concernant notamment les conditions de milieu (nature du milieu, pH, température d'incubation...) et la durée des épreuves, qui donne le moment où la lecture est optimale. Toutes les prescriptions ainsi définies sont bien sûr à respecter scrupuleusement d'un test à l'autre.

Par ailleurs, le recours à des éléments de contrôle positifs et négatifs ainsi qu'à la comparaison avec une préparation de référence dans le cas d'une investigation quantitative, s'avère indispensable pour une interprétation rigoureuse des résultats des analyses sérologiques.

Ces quelques directives, non exhaustives, qui ont pour finalité la réduction au maximum des causes d'erreurs ou d'imprécisions, sont, en fait, celles propres à tout travail de laboratoire et sont appliquées par tout personnel qualifié et bien informé. Elles sont une garantie essentielle pour la fiabilité et la reproductibilité des tests, en particulier pour des opérations de routine automatisées ou non.

III) QUELQUES EXEMPLES D'ACTUALITE

1) La détection de la fraude du lait de chèvre par du lait de vache

Parmi l'ensemble des techniques proposées dans la littérature pour démontrer l'adultération du lait de chèvre par du lait de vache, seule l'électrophorèse en gel de polyacrylamide a fait l'objet d'une préconisation officielle pour être utilisée dans les laboratoires de contrôle français. Cette électrophorèse, conduite sur plusieurs jours, permet de déceler une incorporation de lait de vache au taux minimal de 5 pour cent.

En 1974, DURAND et ses collaborateurs ont proposé d'appliquer, au lieu de la méthode officielle, la technique d'immunodiffusion en gélose. Celle-ci offre l'avantage, pour une sensibilité de même ordre de grandeur, de réduire la durée de l'analyse à 24-48 heures.

Grâce à LEVIEUX qui a réalisé, en 1980, une adaptation originale de la technique d'inhibition de l'hémagglutination en microplaque, dans le but précis de rechercher cette fraude, il est actuellement possible de détecter , en 20 à 30 minutes, une partie de lait de vache dans mille de lait de chèvre.

Cette méthode peut être mise en pratique aussi bien par les services de contrôle pour vérifier la qualité du lait de chèvre ou des fromages " pur chèvre" affinés, que par l'industriel laitier pour l'analyse du lait en vrac.

Le mérite de LEVIEUX est d'avoir su réunir des éléments qui, tout en garantissant la spécificité de la réaction immunologique, ont concouru à une amélioration notable, à la fois de la sensibilité et de la rapidité des tests.

Ainsi, c'est l'immunoglobuline G_1 de vache qui a été retenue comme antigène en raison de son excellente immunogénicité, la stabilité de sa structure antigénique et sa très grande spécificité d'espèce. L'utilisation de la chèvre pour la production du sérum anti rend absolue la spécificité de ce sérum à l'égard des immunoglobulines G_1 de vache. Enfin, le choix des globules rouges de poulet, sédimentant plus rapidement que ceux de mouton (20 minutes au lieu de 60) avance dans le même rapport le moment de la lecture des résultats. L'emploi de concentrations optimales en agent couplant et en antigène lors de la sensibilisation des globules rouges et le soin apporté à la réalisation des dilutions revêtent une importance décisive pour le résultat final de l'analyse.

L'auteur indique que la précision des résultats obtenus est d'environ 30 pour cent. L'erreur possible est, par conséquent, très grande pour des fraudes de plus de 10 pour cent, mais beaucoup plus réduite pour les fraudes plus courantes de 1 à 10 pour cent.

2) La recherche des protéines végétales incorporées aux produits carnés

Les protéines végétales ont acquis un grand intérêt pour les industriels de l'alimentation. Utilisables en tant qu'adjuvant de fabrication, elles peuvent surtout remplacer avantageusement les protéines d'origine animale devenues rares dans certaines régions ou d'un coût de production extrêmement élevé. L'adultération de produits carnés par des protéines

d'origine végétale, alors vendues au prix des protéines animales, est d'autant plus aisée que la technologie actuelle permet de fabriquer des produits carnés dits restructurés, à partir de constituants dont la véritable nature ne peut être décelée par le consommateur.

Au laboratoire, la séparation des protéines végétales des protéines animales est réalisable, en raison de leur poids moléculaire différent, par des techniques physiques d'analyse. Cependant, la combinaison de celles-ci avec des techniques sérologiques aboutit à une meilleure sensibilité de l'examen et à une identification spécifique des composants d'une denrée.

Malgré tout, le recours aux méthodes immunologiques n'est pas sans faire surgir quelques problèmes, comme le remarquent plusieurs chercheurs.

Ainsi BAUDET, de même que SINELL , insiste essentiellement sur la difficulté rencontrée pour mettre en solution les protéines végétales à partir d'une denrée qui a subi, lors de sa fabrication, des contraintes thermiques importantes. Ce défaut de solubilisation est à rattacher principalement à l'apparition de liaisons entre protéines et glucides par réaction de Maillard. D'autres réactions interviennent également qui sont susceptibles en outre de modifier la structure antigénique spécifique des protéines : combinaison entre acides aminés ; coupure hydrolytique des chaînes peptidiques.

Ajoutées à une extraction en milieu alcalin qui assure une meilleure solubilisation des protéines à analyser, des épreuves comparées, entre échantillons de denrées à tester et produit standard obtenu par une même technique de fabrication, permettent d'obtenir des résultats analytiques très proches des teneurs réelles de la denrée en protéine recherchée.

LLEWELLYN et SAWYER, lors de recherches de protéines de soja dans les produits carnés, montrent bienqu'il n'existe aucune réaction croisée entre le sérum anti protéines de soja et des protéines d'origine animale. Par contre, ils observent des réactions non spécifiques de ce

sérum avec, d'une part, d'autres protéines végétales (colza, haricot, pois) et d'autre part, des épices ou des condiments (cannelle, coriandre, cardamome, noix muscade, poudre d'oignon). Il doit être noté cependant que, dans ce dernier cas, les réactions croisées sont apparues uniquement avec des extraits forts d'épices, c'est-à-dire à une concentration tout à fait inhabituelle dans les denrées alimentaires du commerce.

L'immuno-absorption du sérum anti avec les substances incriminées garantit la spécificité absolue des tests d'identification.

En fait, à l'heure actuelle, l'obstacle réel à une recherche sérologique des protéines végétales dans les produits carnés réside surtout dans l'ignorance du chercheur quant à la nature de la protéine végétale incorporée. Les protéines de soja, de gluten de blé sont maintenant couramment employées comme substances de remplacement des protéines animales dans les produits carnés. Mais les recherches des industriels laissent penser que des protéines végétales de plus en plus variées pourront servir rapidement de constituants de substitution; c'est le cas des protéines provenant de graines de légumineuses (fève, fèverolle, pois), de tourteaux d'oléagineux (colza, tournesol), voire d'algues ou de microorganismes.

3) *La recherche de résidus de substances toxiques dans les aliments d'origine animale*

Un résidu toxique peut se définir comme la quantité généralement faible d'une substance quelconque, chimiquement définie, dont la présence anormale dans la denrée, peut entraîner à plus ou moins long terme des manifestations d'ordre pathologique pour l'organisme qui en subit l'action régulière ou répétée dans le temps.

Certaines de ces substances sont susceptibles d'être identifiées par des méthodes sérologiques. C'est le cas des oestrogènes et des aflatoxines qui ont été mis en cause à maintes reprises par les associations de consommateurs et les hygiénistes de l'alimentation.

Ces deux substances n'ont pas la capacité d'induire la fabrication d'anticorps. Pour obtenir un sérum anti, elles doivent donc être préalablement combinées avec une protéine de poids moléculaire suffisant, généralement l'albumine sérique bovine; le couplage est facilement réalisé par le procédé de l'anhydride mixte à partir d'un dérivé O-carboxyméthyloxime de l'haptène dont la présence est suspectée dans la denrée à analyser. L'immunsérum recueilli possède une double activité anticorps: avant toute expérience, il est donc indispensable de saturer les sites propres à l'albumine sérique bovine afin d'éviter toute réaction non spécifique.

En ce qui concerne les méthodes de dosage, il faut dire que la précision n'est pas le problème important puisqu'il s'agit surtout de donner un ordre de grandeur de la quantité de résidus présents, une erreur de 50 pour cent étant tolérable. Par contre, leur sensibilité doit être extrêmement grande. Ainsi, les nouvelles méthodes d'analyse sérologique, radio-immunologiques et immuno-enzymatiques, parfaitement mises au point pour le diagnostic des maladies infectieuses et en cours d'étude ou d'adaptation en analyse alimentaire, offrent un grand intérêt dans ce domaine.

BIERMANN et TERPLAN, en 1980, ont appliqué la méthode immuno-enzymatique dite ELISA à la détection de l'aflatoxine B_1. Cette mycotoxine, ingérée par les animaux consommant des tourteaux d'arachide contaminés par des Aspergillus , se retrouve essentiellement dans le lait puis les produits dérivés. La limite de contamination admissible des laits de consommation recommandée par l'O.M.S. est de 0,5 p.p.b. La méthode préconisée par ces chercheurs, d'une rigoureuse spécificité, présente un seuil de détection de 800 femtogrammes/ml et permet donc de déceler des doses d'aflatoxine B_1 jugées dangereuses. Mais l'application pratique de cette méthode n'est pas encore effective pour une recherche dans les denrées alimentaires.

Quant à la recherche des oestrogènes dans les denrées animales, DUPUY, en 1978, l'effectue par dosage radio-immunologique. Ces hormones stéroïdiques sont employées chez les animaux d'élevage à des fins zootechniques ou thérapeutiques. Les oestrogènes artificiels sont susceptibles

chez les animaux traités de laisser des résidus que l'on retrouve dans les denrées alimentaires et qui, notamment en ce qui concerne le diéthylstilboestrol, peuvent avoir indiscutablement un effet dangereux pour le consommateur. La sensibilité de la méthode radio-immunologique utilisée est de 0,01 p.p.b. avec une spécificité et une précision jugées satisfaisantes pour des analyses de graisse, de rein, de foie et de muscle.

Le fait que les quantités à mesurer sont extrêmement faibles n'a pas une incidence prépondérante dans le contrôle analytique des produits d'origine animale contenant d'éventuels résidus de substances toxiques. Mais c'est la connaissance exacte de la substance recherchée qui constitue le point délicat et essentiel de la réalisation de la réaction antigène-anticorps. Or il existe de très nombreux oestrogènes possédant des formules chimiques très différentes et de nouvelles spécialités apparaissent chaque jour sur le marché. La possibilité de détecter ces substances dans les denrées n'apparaît alors qu'avec un certain décalage dans le temps par rapport au moment où le produit est disponible dans le commerce. Enfin, ajouté à cela, il faut remarquer que les résidus de ces substances peuvent être constitués de métabolites aux propriétés différentes du produit d'origine, ce qui peut fausser le résultat de l'extraction et de l'analyse sérologique.

CONCLUSION

L'industrie de la transformation dans le secteur alimentaire a pris à notre époque une ampleur considérable et fournit sur le marché une quantité importante de produits très diversifiés.

Or, plusieurs phénomènes soulèvent aujourd'hui le problème du contrôle de la qualité de ces produits finis :

- tout d'abord, le coût de production élevé ou la rareté de certaines protéines animales pousse les industriels à rechercher des constituants de remplacement moins coûteux,
- par ailleurs, les technologies nouvelles leur imposent dans une certaine mesure l'utilisation d'adjuvants de fabrication,
- enfin, en relation directe avec les techniques modernes de l'agriculture et de l'élevage, de nombreuses substances, administrées aux animaux à des fins zootechniques ou thérapeutiques, peuvent laisser subsister des résidus dans les denrées offertes au consommateur; il en va de même lorsque ces animaux consomment des aliments traités par des produits chimiques ou contaminés par diverses toxines.

De telles substances doivent pouvoir, dans le souci d'éviter les fraudes et de protéger la santé du consommateur, être détectées dans les produits finis de façon précise et certaine.

A côté de méthodes organoleptiques, histologiques, physiques et chimiques qui conservent assurément toute leur valeur dans certains

cas, les méthodes sérologiques que nous avons envisagées s'avèrent, du fait de leur spécificité et de leur sensibilité, d'un grand intérêt pour ce genre de recherche. Elles offrent, en outre, une fiabilité indéniable, si tant est que l'on fasse preuve d'une grande rigueur technique et d'une grande prudence de raisonnement. A ce moment-là une standardisation de ces méthodes en vue d'analyses de routine devrait permettre de leur attribuer, sur le plan légal, plus de valeur qu'elles n'en ont actuellement.

Vu : Le Professeur de l'Ecole Vétérinaire rapporteur

Professeur Ch. LABIE

Vu : Le Directeur de l'Ecole Vétérinaire

Professeur R. LAUTIE

Vu : Le Président de la Thèse

Professeur ROUX

VU ET PERMIS D'IMPRIMER
Toulouse, le 05 FEV. 1982
L'Administrateur provisoire de l'Université Paul Sabatier

UNIVERSITÉ PAUL SABATIER TOULOUSE

Professeur D. BANCEL

BIBLIOGRAPHIE

ABE (T) - Serological identification of animal proteins - Japan Agric.Res. Q./q 1973, 7, 1, 47.50

ABE (T), OZAWA (S), YANO (S), MOGI (K) - Immunological discrimination of poultry meats - Japan Poultry Sci. 1971, 8, 3, 150.155

APSNER(V), LJUBIC (I) -(Adaptation de la précipitation en agar-gel pour la mise en évidence de viande de boeuf dans les saucissons) Vet.Glasn. 1969,23, 6, 445.450

ARTAZ (C), BIANCHI (M) - La diagnosis di specie delle carni mediante micro-immuno-elettroforesi su acetato di cellulosa gelatinizzato. Clin.Vet. 1973, 96,11, 381.385

BARTEN (U) - Immunologische Untersuchungen an einigen wasserlöslichen Muskeleiweisser - Thèse Méd.Vét. Berlin 1965

BAUDET (J) - Solubilisation des protéines végétales à partir de mélanges complexes ayant subi des contraintes thermiques - Ann.Nutr. Aliment. 1977, 31 , 2, 135.140

BAUDNER (S) - Analysis of plant proteins using immunological techniques based on the antigen-antibody precipitation - Ann.Nutr.Aliment. 1977, 31, 2, 165.178

BAUDNER (S), SCHEIGE (R), GUNTHER (H) - Bestimmung von Sojaeiweiss in hocherhitzten Fleischwaren - Mitt.Geb.Lebensmittelunters. u.Hyg. 1977, 68, 2, 183.185

BERKMEN (L), DEMIRER (M.A.) - Differentiation of ox and buffalo meats by means of precipitation tests - Türk. Vet. Hekim. Dern.Derg. 1964, 34, 3/4, 136.143

BESSEMANS (J), LAMBION (R) - Recherche des protéines étrangères dans les produits de viande. Application des techniques immuno-électrophorétiques - Revue Ferment. Ind.Aliment. 1972,27,61.70

BIERMANN (A), TERPLAN (G) - Nachweis von Aflatoxin B_1 mittels ELISA - Arch. Ledensmittelhyg. 1980, 31, 2, 51.57

BONNAND (O) - Détermination sérologique de la composition des mélanges de viande crue - Ann. Falsif. Expert. Chim. 1961, 627, 121.131

BONNAND (O) -Détection d'organes de cheval dans les produits carnés cuits. La méthode de floculation. L'antigène de Forssmann - Encycl.Vét période. 1964, 21, 5, 276.278

BONNAND (O) - Préparation et utilisation de sérums précipitants - Encycl. vét.période. 1964, 21, 278.281

BUBLOZ (A) - Contribution au dépistage de falsifications de préparations de viande par adjonction de viande de cheval. Application de la méthode de double diffusion dans le gel (Ouchterlony) - Zentbl. Vet.Med. 1962, 9 , 961.977

CATSIMPOOLAS (N) - Studies on the characterization of soybean proteins by immuno-electrophoresis - Arch. Biochem. Biophys. 1968,127, 1, 338.345

DAUSSANT (J), LAURIERE(C), BAUDET (J), MOSSE (J) - Identification immuno-chimique de protéines de tournesol et de féverolle dans les produits filés ou extrudés soumis à des contraintes physico-chimiques ou thermiques - Ann.Nutr.Aliment. 1977, 31, 2,161.164

DEGENKOLB (E), HINGERLE (M) - Untersuchungen über den serologischen Nachweis von Fremdeiweisszusätzen in hitze denaturierten Fleicherzeugnissen - Arch. Lebensmittelhyg.1967, 18, 11, 241.247

DEGENKOLB (E), HINGERLE (M) - Eine serologische Schnellmethode zum quantitativen Nachweiss von Fremdeiweisszusätzen in hitze denaturierten Fleischerzeugnissen - Arch. Lebensmittelhyg. 1969,20, 4, 73.84

DELCHEV (K), DIKOVA (N) - (Préparation de sérum précipitant les protéines de soja traitées par la chaleur, le caséinate de sodium et le lait sec) - Vet.Med. 1977, 14, 7, 62.68

DUPUY (C) - La méthode de dosage des oestrogènes par radio-immunologie et son application à la recherche des résidus - Thèse Méd. Vét. Alfort 1978

DURAND (M), MEUSNIER (M), DELAHAYE (J), PRUNET (P) - Détection de l'addition frauduleuse de lait de vache dans les laits de chèvre et de brebis par la méthode de l'immunodiffusion en gélose - Bull.Acad. Vét. 1974, 48, 5, 247.258

DURAND (M), SCHNEIDER (R) - Immuno-électrophorèse des jus de viande et son application dans la détection des fraudes - Arch. Inst.Pasteur Tunis, 1962, 39, 2, 153.163

ENOCH (C) - Zur biologischen Differenzierung von Trockenblutplasma in hocherhitzten Fleischwaren. Vergleichende Untersuchungen mittels Agar.Gel.Diffusion, Immunelektrophorese und indirecter Hämagglutination - Thèse Méd.Vét. Munich, 1967

ETIEVANT (M) - Bases moléculaires de la réaction antigène-anticorps. Principes des méthodes de précipitation, d'hémagglutination. Limites de ces méthodes - Ann.Nutr.Aliment. 1977, 31, 2, 141.151

FROMM (G) - Zum immunologischen Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiss in Fleischkonserven - Arch.Hyg. Bakt. 1964, 151, 702

GAJOS (E) - (Adaptation d'un test de précipitation en milieu gélifié pour la détermination de protéines spécifiques de lait, sang, jaune d'oeuf et tissus, et utilisation en hygiène alimentaire) Weterynaria, 1961,9 , 33.54

GERIGK (K), KRUGER (H) - Untersuchungen zur Extraction von Fremdeiweiss aus Fleischwaren- Zentbl.Vet.Med(B), 1972, 19, 3, 226.237

GUINEE (P), WILLEMS (H) - Studies on the biological determination of heat denatured muscle proteins by means of precipitation tests - Proc. 3rd Symp. Wld. Ass. Vet.Food. Hyg (Nice), 1962,34.35

GUNTHER (H) - Bestimmung von Fremdeiweiss in Fleischwaren - Arch.Lebensmittelhyg. 1969,20, 5, 97.106 et 6, 128.131

GUNTHER (H) - Zum Nachweiss von Fremdeiweiss in Fleischwaren mit Hilfe von Celluloseacetat-Folien - Mitt.Bl.GDCh. Lebensmittelchemie ger. Chemie, 1969, 23, 12, 303

GUNTHER (H) - Zum Nachweiss von Fremdeiweiss in Fleischwaren mit Hilfe von Celluloseacetat-Folien - Mitt. Bl. GDCh. Lebensmittelchemie ger.Chemie, 1971, 25, 4, 110

GUNTHER (H) - Nachweiss von Fremdeiweiss in Fleischwaren - Mitt.Geb. Lebensmittelunters. u.Hyg. 1974, 65, 3, 242.246

GUNTHER (H) - Detection of plant proteins in meat products. I. Methods an results of routine work - Ann.Nutr.Aliment 1977, 31, 2, 179.182

HANSON (L.A) - Immunological technique for the detection of milk proteins in food products - Nord.Vet.Med 1964, 16, 201.205

HAUSER (E), BICANOVA (I), KUNZLER (W) - Erfassung fleischfremder Eiweisse in behandelten Fleischwaren durch ein standardisiertes Immundiffusionsverfahren - Fleischwirschaft. 1974, 54, 2, 240.242

HAY (D) - Identification of the origin of animal protein by agar-gel diffusion - Nature , 1962, 196, 995

HAYDEN (A.R.) - Detection of chickenflesh in beef sausages - J. Fd.Sci. 1977, 42, 5, 1189.1192

HAYDEN (A.R.) -Determination of residual species serumalbumine in adulterated ground beef - J.Fd.Sci. 1978, 43 , 2, 476.478, 492

HAYDEN (A.R.) - Use of antisera to a heat-stable antigen from equin adrenals for detection of horse meat in cooked beef sausages - J.Anim.Sci . 1979, 49 (suppl.1,) 221222

HAYDEN (A.R.) - Immunochemical determination of species of origin of meat products - Diss. Abst. Int. 1980, 40B , 8, 3645

HEBEL (R.D.) - Radio-immunoassay : Methodik und Einsatzmöglichkeit in der Lebensmitteluntersuchung - Fleischwirtschaft, 1975, 55, 6,812.813

HEEWER (L.W van den) - Serological identification of meat from different species by the agargal diffusion method - J.S.Afr. Vet.Med.Ass. 1962, 33, 3, 215.221

HEEWER (L.W van den), MARAIS (S) - Specific serological identification of ostrich meat and meat products - J.S.Afr.Vet.Med.Ass. 1975,46 3, 261.263

HELLMANN (E), QUENTIN (E) - Zum Nachweiss der Verarbeitung von frischem Hühnereiklar in Brünhwürsten mit Hilfe der Präzipitationsreaktion -Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 1968, 81, 22, 444.447

HERRMANN (C) - Uber den Nachweiss von hitze denaturierten Hühnereiklar in Fleischwaren mit Hilfe der indirecktен Hämagglutination - Thèse Méd.Vét. Munich, 1963

HERRMANN (C) -Uber die zugleich quantitative Differenzierung von erhitztem Eiweiss mittels der indirecktен Hämagglutination - Berl.Münch. tierärztl. Wschr, 1965, 78, 19, 370.371

HERRMANN (C)- Zum quantitativen Nachweiss von aufgeschlossenem Milcheiweiss in hocherhitzten Fleischwaren mit Hilfe der indirekten Hämagglutination - 11. Europäischen Kongress der Fleischforscher. Belgrade 1965

HERRMANN (C)- Gewinnung von Antiseren für den Nachweiss von Fremdeiweiss in hocherhitzten Fleischerzeugnissen - Arch. Lebensmittelhyg. 1968, 19, 12, 270.272

HERRMANN (C), HARTOG (E.J), THOMA (H) - Wie sicher ist der serologische Nachweiss von Fremdeiweissen in Fleischerzeugnissen ? - Fleischwirtschaft 1975, 55, 6, 808.810

HERRMANN (C), HOLPERT (D), PFEIFFER (G) - Zur serologischen Erfassung von aufgeschlossenem Milcheiweiss in hocherhitzten Fleicherzeugnissen - Arch. Lebensmittelhyg. 1966, 17, 1, 12.13

HERRMANN (C), KOTTER (L) - Serologische Verfahren bei der Uberwachung von Fleicherzeugnissen - Arch. Lebensmittelhyg. 1968, 19, 12,265.267

HERRMANN (C), KOTTER (L) - Serologische Differenzierung einer 4000 jahre alten Fleischprobe mittels Präzipitation - Berl.Münch.tierärztl. Wschr , 1972, 85, 1, 11.14

HERRMANN (C), MERKLE (C) - Zur Standardisierung und Konservierung der sensibilisierten Hammelerythrozyten für die indireckte Hämagglutination zur Nachweiss von Fremdeiweiss - Arch.Lebensmittelhyg. 1971, 22, 9, 189.192

HERRMANN (C) , MERKLE (C), KOTTER (L) - Zur Problematik serologischer Nachweisreaktion für Fremdeiweiss in erhitzen Fleischerzeugnissen ; 1 - Präzipitationsreaktion - Fleischwirtschaft.1973 53, 1, 97.105

HERRMANN (C), MERKLE (C), KOTTER (L) - Zur Problematik serologischer Nachweisreaktion für Fremdeiweiss in erhitzen Fleischerzeugnissen , 2. Agglutinationsreaktion - Fleischwirtschaft 1973, 53, 2, 249.251

HERRMANN (C), MERKLE (C), KOTTER (L) - The problem of serological reactions for detecting foreign proteins in heated meat products - Ann. Nutr. Aliment. 1977, 31, 2, 153.156

HERRMANN (C), WAGENSTALLER (G) - Uber den Nachweiss vonSoja Protein in Fleischerzeugnissen mittels der indirekte Hämagglutination - Arch. Lebensmittelhyg. 1973, 24,6, 131.134

HOFFMANN (B) -Use of radioimmunoassay for monitoring hormonal residues in edible animal products - J.A.O.A.C., 1978, 61, 5, 1263.1273

HOLPERT (D) -Zum histochemischen und immunhistochemischen Nachweiss von Milcheiweiss in Brühwürsten - Thèse Méd.Vét. Munich, 1965

HYSLOP (N.S.) - Extraction methods and test techniques for detection of vegetable proteins in meat products: I..Qualitative detection of soja derivatives - J. Hyg. Camb. 1976, 76, 3, 329.336

JOUVE (J.L.) - Essai d'identification spécifique des poissons par une méthode sérologique - Thèse Méd. Vét. Alfort 1968

KAMIYAMA (T), KATSUBE (Y), IMAIZUMI (K) - Serumalbumin contents in meat extracts in relation to serological identification of animal species of meats - Jap.J.Vet.Sci. 1978, 40, 5, 559-563

KAMIYAMA (T), KATSUBE (Y), IMAIZUMI (K) - Serological identification of animal species of meat by a passive hemagglutination inhibition test using cross-reacting anti-serumalbumin antiserum - Jap.J. vet.Sci. 1978, 40, 6, 653.661

KAMIYAMA(T) , KATSUBE (Y), IMAIZUMI (K) - Serological identification of animal species of meat using species-specific anti-serumalbumin antibodies obtained by immunoadsorbent chromatography - Jap.J.Vet.Sci. 1978, 40, 6, 663-669

KAMM (L) - Immunochemical quantitation of soybean protein in raw and cooked meat products - J.A.O.A.C, 1970, 53, 1248.1252

KARPAS (A), MYERS (W), SEGRE (D) - Serologic identification of sausage meat origin - J.Fd.Sci. 1970, 35, 1, 150.155

KATSUBE (Y), IMAIZUMI (K) - Serological differentiation of animal meats - J.J.Vet.Sci. 1968, 30, 2, 219.232

KLOPSTOCK (A), SCHWARTZ (J), LEVY (S) - (Techniques sérologiques pour l'identification de viandes d'espèces différentes en présence de polyphosphates) - Refuah Vet. 1964, 21, 45

KLUGE-WILM (R) - Serologischen Nachweiss von Milcheiweiss in Hocherhitzten Fleischwaren - Thèse Méd. Vét. Berlin 1967

KOIE (B), DJURTOF (R) - Changes in the immunochemical response of soybean proteins as a result of heat treatment - Ann.Nutr.Aliment. 1977, 31, 2, 183.186

KOTTER (L)- Zur Differenzierung der Proteinen von Fleischwaren - Berl.Münch tierärztl. Wschr 1964, 77, 22, 433.436

KOTTER (L), HERRMANN (C) - Die indirekte Hämagglutination als Nachweisreaktion für Fremdeiweisse - Arch. Lebensmittelhyg. 1968, 19, 12, 267.270

KOTTER (L), HERRMANN (C) - Methoden zum Nachweis von Fremdeiweiss nach den serologischen Verfahren - Fleischwirschaft 1969,49,9,1175.1178

KOTTER (L), HERRMANN (C), CORSICO (G) - Zum quantitativen Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiss in hocherhitzten Fleischwaren mit Hilfe der indirekten Hämagglutination - Z.Lebensmittelunters.u. Forsch. 1966, 133, 15

KOTTER (L), HERRMANN (C) , RING (C), CORSICO (G) - Untersuchungen zur Steigerung der Antikörperbildung gegen erhitztes Eiweiss mittels Metallverbindungen - Zentbl.Vet.Med. B, 1966, 13, 613.635

KOTTTER (C), PALITZSCH (A), HERRMANN (C) - Technologische Bedeutung von Fremdeiweiss bei der Fleischwaren verarbeitung - Arch.Lebensmittelhyg. 1968, 19, 12, 261.263

KRAACK (J) - Bestimmung von Fremdeiweiss in Wurstwaren. Immundiffusion als Screeningtest. Indirekte Hämagglutination - Fleischwirtschft 1973,53, 5, 697.702

KRUGER (H) - Versuche zum serologischen Nachweiss von Sojaprotein in Fleischwaren - Thèse Méd. Vét. Berlin 1970

KRUGER (H), GROSSKLAUS (D) - Untersuchungen zum serologischen Nachweiss von Sojaprotein in erhitzten Fleischerzeugnissen. I. Probleme der Antiserumherstellung- - Fleischwirtschaft 1970, 50, 11, 1529.1539

KRUGER (H), GROSSKLAUS (D) - Untersuchungen zum serologischen Nachweiss von Sojaprotéin in erhitzten Fleischerzeugnissen. 2. Untersuchungen mit Hilfe der indirekten Hämagglutination und der Immunelektrophorese - Fleischwirtschaft 1971, 51, 2, 181.188

KRUGER (H), GROSSKLAUS (D) - Untersuchungen zum serologischen Nachweis von Sojaprotein in erhitzten Fleischerzeugnissen. 3. Untersuchungen mit Hilfe der quantitativen Präzipitätmessung - Fleischwirtschaft 1971, 51, 3, 315.320

KUBOTA (Y) - Differentiation of meat from various animals by the precipitation test - Bull. Azabu. Vet. Coll. 1967, 16, 133.169

LEVIEUX (D) - Mise en évidence rapide et sensible du lait de vache ajouté au lait de chèvre par inhibition de l'hémagglutination - Ann. Rech. Vét. 1980, 11, 2, 151-156

LLEWELLYN (J.W.), SAWYER (R) - The application and limitation of immunochemical analyses in the estimation of soja protein in meat products - Ann. Nutr. Aliment. 1977, 31, 2, 157.160

MANZ (J)- Serologische Untersuchungen an Extracten aus Muskulatur von Rind Schaf, Ziege und Reh. - Fleischwirtschaft 1979, 59, 3,408.410

MANZ (J) - Serologischer Nachweiss tierartspezifischer Antigene in Extracten aus Muskulatur von Kaninchen und Feldhasen - Fleischwirtschaft 1980, 60, 4, 763.765

MAZZARACHIO (V), RAVAIOLI (L) - Serum precipitation tests with monospecific sera for species identification of manufactured and preserved meat - Proc. 3 rd Symp. Wld Ass. Vet. Food.Hyg Nice, 1962,31.33

MILGROM (F), TUGGAC (Z.M), WITEBSKY (E) - Studies on species specificity- J.Immun. 1964, 93, 902.909

OGIELSKI (L), GAJOS (E) - Serological examination of meat and meat products Med.Vet. 1962, 18, 348.350

OZAWA (S), YANO (S), ABE (T), MOGI (K) - Discrimination of animal species by immunological method : 2.Experiments on cooked meat - Jap. J. zootech.Sci. 1972, 43, 7,395.399

PETER (M) - Die vertikale Immundiffusion : ein Hilfsmittel zur quantitativen Beurteilung von Fremdeiweisszusätzen in Fleischwaren - Arch. Lebensmittelhyg. 1970,21, 10, 220.222

PINTO (F.C) - Serological identification of ox, buffalo, goat and deer flesh Br.Vet.J. 1961,117, 540.544

PIROIRD (R), LOMBARD (M) - Les méthodes immuno-enzymatiques et leurs applications sérologiques - Revue Méd.Vét. 1980, 131, 1, 25.42

POMERANZ (Y), MELOAN (C) - Food analysis : theory and practice - Avi Publishing Company, 1971, 669 p.

PSOTA (A), CONSTANTPOULOU (M) - Nachweiss von Blutplasma mit Hilfe der Immundiffusionsmethode - Fleischwirtschaft 1972, 52, 10,1290

RADAN (M) - A non-specific precipitation in the presence of polyphosphates with ground meat intended for the manufacture of sausages and salami - Proc. 3rd.Symp.Wld Ass.Vet.Food Hyg. Nice, 1962,36.37

RANTALA (M), NURMI (E) - The demonstration of soja protein in meat products by gel precipitation - Suom. Eläinlääklehti, 1973, 79, 535.539

SCHECK (K) - Erfahrungen bei der Gewinnung von Antisera für Fremdeiweissnachweiss - Fleischwirtschaft 1980, 60, 3, 406

SCHLOTFELDT (H.J) - The gel diffusion test in meat inspection - Rev.Vet. Venez. 1962, 13, 27.57

SCHMOLDT (R) - Versuche zum serologischen Nachweiss der Erhitzung von Kochschinken - Thèse Méd.Vét. Berlin 1969

SHUNMUGAM (A.M), RANGANATHAN (M) - Differentiation of mutton and beef by precipitation test - Indian Vet. J. 1972, 49, 10, 1024.1028

SINELL (H.J) - Zum serologischen Nachweiss von Wurstfälschungen - Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 1961, 74, 6, 107.109

SINELL (H.J) - Biologischer Nachweis von hitze denaturierten Muskeleiweiss- Zentbl.Vet.Med. 1961,8 , 57.100, 101.122

SINELL (H.J) - Verarbeitung von Hühnereiweiss in Brühwürst - Berl.Münch. tierärztl.Wschr, 1962, 75, 3, 48.51

SINELL (H.J) - Methoden zur Bestimmung der Fleischart in Fleischwaren - Proc. 3rd. Symp. Wld. Ass. Vet.Food Hyg. Nice 1962,23.30

SINELL (H.J) - Immunologische Eigenschaften einiger wasserlöslicher Muskeleiweisse - 12.Europäischen Kongress der Fleischforscher. Sandefjord 1966

SINELL (H.J) - Immunologische Eigenschaften einiger wasserlöslicher Muskeleiweisse - Berl. Münch. tierärztl. Wschr 1967,80, 4, 70.74

SINELL (H.J) - Probleme bei der Spezies - Identifizierung von Proteinen in Lebensmittel - Arch. Lebensmittelhyg. 1968, 19, 6, 121.125

SINELL (H.J), KLUGE-WILM (R) - Immunelektrophoretischer Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiss in erhitzten Fleischerzeugnissen und Versuche zu einer quantitativen Auswertung - Zentbl. Vet.Med.B 1968, 15, 7, 802.814

SINELL (H.J), LANGNER (H.J) - Beitrag zur Identifizierung der Tierartzugehörigkeit von Fleisch in Fleischkonserven - Fleischwirtschaft 1966, 46, 1, 34.37

SINELL (H.J), MENTZ (I) - Papierelektrophoretische Untersuchungen an Seren für die biologische Eiweissdifferenzierung. I.Mitteilung : Vorversuche mit Nativ-Antigenen - Berl. Münch. tierärztl.Wschr. 1962, 75,10, 181.183

SINELL (H.J), MENTZ (I)- Papierelektrophoretische Untersuchungen an Seren für die biologische Eiweissdifferenzierung. II. Mitteilung: Versuche mit Thermo-Antigenen - Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 1964, 77, 13, 253.258

SINELL (H.J), MENTZ (I) - Serologische Spezies-Identifizierung hitze denaturierter Muskelproteine mittels Harnstoffextraction - Berl. Münch. tierärztl. Wschr 1969, 82, 3, 55.58

SINELL (H.J), MENTZ (I) - Mikrotiter-Hämagglutinationshemmung zum Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiss in Fleischerzeugnissen - Wien. tierärztl. Mschr. 1973,60, 2.3, 79.83

SINELL (H.J), MENTZ (I)- Zum quantitativen Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiss mittels Elecktro-immunodiffusion - Arch. Lebensmittelhyg. 1975, 26, 12, 41.46

SINELL (H.J), MENTZ (I) - Use of electro-immunodiffusion for quantitative determination of non meat proteins added to meat products - Folia Vet. Latina, 1977, 7, 41.54

SINELL (H.J), SCHMOLDT (R) - Immunelektrophoretischer Nachweis der Erhitzung von Kochschinken - Fleischwirtschaft 1972, 52, 4, 459.462

SINGH (B.S), YADAV (P.C) - Close species relationship demonstrated by the precipitation test between the cow and the buffalo - Indian Vet. J. 1962, 39, 40.42

STUTZ.BAASCH (M.L) - Versuche zur Standardisierung des Nachweises von aufgeschlossenem Milcheiweiss in Fleischerzeugnissen mit Hilfe der Agglutination - Thèse Méd.Vét. Munich 1972

TAGORE (S.S.R), VENKATESAN (E.S.), RAMAMURTHI (R) - The differentiation of beef from buffaloflesh by immuno-double diffusion test- Cheiron, Tamil Nadu J.Vet. Sci. anim. Husb. 1977, 6, 2, 134.135

TARANTINI (S), SAU (F) - L'immunoelettroforesi nell'identificazione di specie delle carni fresche e insaccate - Arch. Vet.Ital. 1980, 31, 1/2, 41.43

THORSON (B), HØYEM (T) - (Méthode pour la mise évidence de protéines étrangères dans les produits carnés) - Medlemsbl. Norske VetForen. 1969,21, 7.8, 394.397

WAGENSTALLER (G) - Nachweis von Sojaprotein in hocherhitzten Fleischerzeugnissen mit Hilfe der standardisierten indirekten Hämagglutinationsreaktion - Thèse Méd. Vét. Munich. 1972

WARNECKE (M.O), SAFFLE (R.L.) - Serological identification of animal proteins: I.Mode of injection and protein extracts for antibody production - J.Fd.Sci. 1968,33 , 1, 131.135

WERSCHING (S) - Der Nachweis von Walfleisch in Fleischwaren - Arch.Lebensmittelhyg. 1960, 11, 173

WITTMANN (J), KOTTER (L), SCHMIDT (H) - Nachweis von Fremdeiweiss in Fleischerzeugnissen mittels nichtserologischer methoden - Arch. Lebensmittelhyg. 1968, 19, 12,272.274

WYLER (O) - Soja Eiweiss, Nachweis in Fleischwaren und in anderen Lebensmitteln. - Mitt. Geb. Lebensmittelunters u. Hyg. 1968, 59 5, 401.402

WYLER (O) Routine-Untersuchungsmethoden für Fleisch und Fleischwaren. I. Mitt Immunologische Nachweis von Milcheiweiss und Sojaprotein - Fleischwirtschaft 1971, 51, 12, 1743.1745

WYLER (O), SIEGRIST (J) - Einfache, empfindliche Nachweismethode für fleischfremde, tierische Eiweissarten - Mitt. Geb.Lebensmittelunters. u. Hyg. 1965, 56, 4, 299.